



Espacenet

Bibliographic data: JP 2004500095 (A)

SIMULTANEOUS STIMULATION AND CONCENTRATION OF CELLS

Publication date: 2004-01-08

Inventor(s):

Applicant(s):

- **international:** **A61K35/14; A61L27/38; A61P35/00; C07K16/28; C12N5/0781; C12N5/0783; C12N5/0789; G01N33/53; A61K35/12;** (IPC1-7): A61K35/14; A61P35/00; C12N5/06; G01N33/53

Classification:

- **European:** A61L27/38; A61L27/38B; A61L27/38H; C07K16/28A; C07K16/28A10; C07K16/28A12; C07K16/28A14; C07K16/28A16; C07K16/28A18; C07K16/28A20; C07K16/28A24; C07K16/28A28; C07K16/28B12; C07K16/28C10; C07K16/28H; C07K16/28Q; C07K16/28R; C07K16/28V; C07K16/28Z; C12N5/06B11B; C12N5/06B11C; C12N5/06B11P

Application number: JP20010562670T 20010226

Priority number(s): US20000184788P 20000224; US20000249902P 20001117; WO2001US06139 20010226

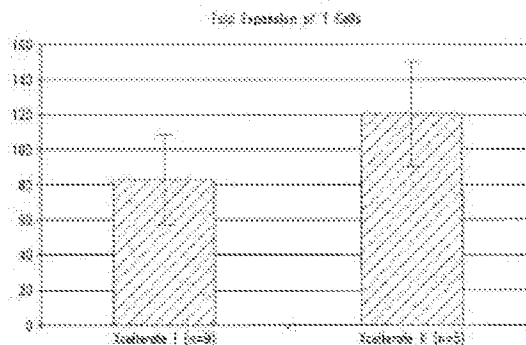
Also published as:

- WO 0162895 (A2)
- WO 0162895 (A3)
- MX PA02008265 (A)
- IL 151287 (A)
- ES 2302726 (T3)
- more

Abstract not available for JP 2004500095 (A)

Abstract of corresponding document:
WO 0162895 (A2)

The present invention relates generally to methods for stimulating cells, and more particularly, to a novel method to concentrate and stimulate cells that maximizes stimulation and/or proliferation of such cells. In the various embodiments, cells are stimulated and concentrated with a surface yielding enhanced proliferation, cell signal transduction, and/or cell surface moiety aggregation. In certain aspects methods for stimulating a population of cells such as T-cells, by simultaneous concentration and cell surface moiety ligation are provided by contacting the population of cells with a surface, that has attached thereto one or more agents that ligate a cell surface moiety and applying a force that predominantly drives cell concentration and cell surface moiety ligation, thereby inducing cell stimulation, cell surface moiety aggregation, and/or receptor signaling enhancement. Also provided are methods for producing phenotypically tailored cells, including T-cells for the use in diagnostics, drug discovery, and the treatment of a variety of indications, including cancer, viral infections, and immune related disorders. Compositions of cells having specific phenotypic properties produced by these processes are further provided.



(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500095

(P2004-500095A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 5/06

A 6 1 K 35/14

A 6 1 P 35/00

G 0 1 N 33/53

F 1

C 1 2 N 5/00

A 6 1 K 35/14

A 6 1 P 35/00

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

E

Z

D

Y

テーマコード(参考)

4 B 0 6 5

4 C 0 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 231 頁)

(21) 出願番号 特願2001-562670(P2001-562670)

(86) (22) 出願日 平成13年2月26日(2001.2.26)

(85) 翻訳文提出日 平成14年8月23日(2002.8.23)

(86) 国際出願番号 PCT/US2001/006139

(87) 国際公開番号 W02001/062895

(87) 国際公開日 平成13年8月30日(2001.8.30)

(31) 優先権主張番号 60/184,788

(32) 優先日 平成12年2月24日(2000.2.24)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(31) 優先権主張番号 60/249,902

(32) 優先日 平成12年11月17日(2000.11.17)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 502028164

エクサイト セラピーズ, インコーポレ
イテッド

アメリカ合衆国 ワシントン 98104

, シアトル, コロンビア ストリート

1124, スイート 130

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74) 代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74) 代理人 100113413

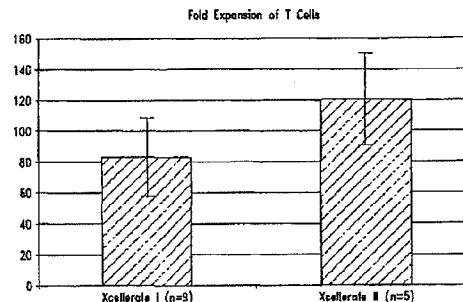
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞の同時の刺激および濃縮

(57) 【要約】

本発明は、細胞を刺激する方法に関し、詳細には、このような細胞の刺激および/または増殖を最大化する細胞を濃縮し、そして刺激する新規の方法に関する。細胞は、増強された増殖、細胞シグナル伝達、および/または細胞表面部分の凝集を生じる表面を用いて刺激され、濃縮される。同時の濃縮および細胞表面部分の連結によってT細胞のような細胞集団を刺激する方法は、細胞集団を表面に接触させることによって、そして細胞の濃縮および細胞表面部分の連結を優勢に駆動する力を適用して、細胞刺激、細胞表面部分の凝集、および/またはレセプターシグナル伝達の増強を誘導することによって提供される。表現型的に変更された細胞を生成するための方法を提供する。これらのプロセスによって生成される細胞の組成物が、提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

同時の T 細胞の濃縮および細胞表面部分の連結によって、T 細胞の集団を刺激するための方法であって、以下：

(a) 細胞の集団を提供する工程であって、ここで該集団の少なくとも一部が T 細胞を含む、工程；

(b) 該細胞の集団を表面に接触させる工程であって、ここで、該表面が、該 T 細胞の少なくとも一部の細胞表面部分を連結しかつ T 細胞の少なくとも該一部を刺激する 1 以上の因子を有し、該因子が該表面に結合している、工程；

(c) T 細胞の濃縮および T 細胞表面部分の連結を優勢に駆動する力を適用し、それによって T 細胞の刺激を誘導する工程、
を包含する、方法。 10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記表面が、T 細胞の第 1 の細胞表面部分を連結する第 1 の因子を有し、該第 1 の因子が該表面に結合しており；そして該表面または第 2 の表面が、該 T 細胞の第 2 の部分を連結する第 2 の因子を有し、該第 2 の因子が該表面または該第 2 の表面に結合しており、ここで、該連結が、該 T 細胞の増殖を誘導する該第 1 の因子および該第 2 の因子による、方法。

【請求項 3】

前記表面が、生体適合性である、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 4】

前記表面が、天然表面または合成表面である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記表面が、ポリマーを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記表面が、コラーゲン、精製タンパク質、精製ペプチド、多糖類、グリコサミノグリカン、および細胞外マトリックス構成物からなる群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記多糖類が、キトサン、アルギナート、デキストラン、ヒアルロン酸、およびセルロースからなる群より選択される、請求項 6 に記載の方法。 30

【請求項 8】

請求項 5 に記載の方法であって、ここで、前記ポリマーが、ポリスチレン、ポリエステル、ポリエーテル、ポリ無水物、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン、ポリビニルアセテート、ブロックコポリマー、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)、およびポリウレタンからなる群より選択される、方法。

【請求項 9】

前記ポリマーが、乳酸を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ポリマーが、コポリマーである、請求項 5 に記載の方法。 40

【請求項 11】

前記コポリマーが、乳酸およびグリコール酸 (PLGA) を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記生体適合性表面が、生分解性である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 13】

前記生体適合性表面が、非生分解性である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 14】

前記非生分解性物質が、ポリ (ジメチルシロキサン) およびポリ (エチレンービニルアセ 50

テート) からなる群より選択されるポリマーを含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

請求項 3 に記載の方法であって、ここで、前記生体適合性表面が、コラーゲン、金属、ヒドロキシアパタイト、ガラス、アルミネート、バイオセラミック物質、ヒアルロン酸ポリマー、アルギナート、アクリル酸エステルポリマー、乳酸ポリマー、グリコール酸ポリマー、乳酸／グリコール酸ポリマー、精製タンパク質、精製ペプチド、および細胞外マトリックス構成物からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 6】

前記生体適合性表面が、移植可能なデバイスと結合される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記デバイスが、ステント、カテーテル、繊維、中空繊維、パッチ、および縫合糸からなる群より選択される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記表面が、ガラス、シリカ、シリコン、コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、ヒドロゲル、PTFE、ポリプロピレン、ポリスチレン、ナイロン、およびポリアクリルアミドからなる群より選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記表面が、脂質、プレート、皿、袋、棒、ペレット、繊維、およびメッシュからなる群より選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記表面が、粒子である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記粒子が、ビーズ、ミクロスフェア、ナノ粒子、およびコロイド粒子からなる群より選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ビーズが、直径約 5 ナノメートル～約 5 0 0 ミクロンである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記因子が、タンパク質リガンド、天然リガンド、および合成リガンドからなる群より独立して選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の方法であって、前記因子が、抗体、抗体フラグメント、ペプチド、ポリペプチド、糖ペプチド、レセプター、ステロイド、ホルモン、マイトジェン、抗原、スーパー抗原、増殖因子、サイトカイン、レクチン、ウイルスタンパク質、接着分子、およびケモカインからなる群より独立して選択される、方法。

【請求項 2 5】

少なくとも 1 つの因子が、抗体または抗体フラグメントである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

第 1 の因子が、抗体および抗体フラグメントであり、そして第 2 の因子が、抗体および抗体フラグメントである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記第 1 の因子および前記第 2 の因子が、異なる抗体である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記第 1 の因子が、抗 CD 3 抗体、抗 CD 2 抗体、または抗 CD 3 抗体もしくは抗 CD 2 抗体の抗体フラグメントである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記第 2 の因子が、抗 CD 2 8 抗体またはその抗体フラグメントである、請求項 2 4 または 2 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 0】

10

20

30

40

50

前記第2の因子が、CD28に対する天然のリガンドである、請求項24または27のいずれかに記載の方法。

【請求項31】

前記天然のリガンドが、B7-1またはB7-2を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記力が、重力より大きい力、水力、膜透過圧によって生成される濾過力、遠心力、および磁力からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項33】

前記磁力が、磁石によって生成され、該磁石は、該磁石の表面で約200 Gaussと約12,000 Gaussとの間の範囲の磁場強度を有する、請求項32に記載の方法。

10

【請求項34】

前記表面が、常磁性粒子の表面である、請求項1に記載の方法。

【請求項35】

前記表面への前記因子の結合が、共有結合、非共有結合、静電気結合、または疎水結合である、請求項1に記載の方法。

【請求項36】

前記連結されているT細胞が、連結されていないT細胞から分離される、請求項1に記載の方法。

【請求項37】

前記T細胞が、免疫応答不全を改善する、請求項1に記載の方法。

20

【請求項38】

同時の細胞表面部分の連結およびT細胞の凝集によるT細胞の刺激のための方法であって、以下：

(a) T細胞を含む細胞集団を提供する工程；

(b) 該細胞集団を表面に接触させる工程であって、ここで、該表面が、細胞表面部分に対して特異的な1以上のリガンドを有し、該リガンドが該表面に結合している、工程；

(c) T細胞および表面の濃縮を駆動する力を適用する工程；および

(d) 所望の刺激を達成するために十分な期間該細胞をインキュベートする工程、を包含する、方法。

【請求項39】

30

前記所望の刺激を達成するために十分な時間が、1分～8日である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記所望の刺激を達成するために十分な時間が、1日～5日である、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記表面が、生体適合性である、請求項38に記載の方法。

【請求項42】

前記表面が、天然表面または合成表面である、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

40

前記表面が、ガラス、シリカ、シリコン、コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、ヒドロゲル、PTFE、ポリプロピレン、ポリスチレン、ナイロン、デキストラン、およびポリアクリルアミドからなる群より選択される、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記表面が、プレート、皿、袋、棒、ペレット、繊維、およびメッシュからなる群より選択される、請求項38に記載の方法。

【請求項45】

前記表面が、粒子である、請求項38に記載の方法。

【請求項46】

前記粒子が、ビーズ、ミクロスフェア、ナノ粒子、およびコロイド粒子からなる群より選

50

択される、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記ビーズが、直径約 5 ナノメートル～約 500 ミクロンである、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記リガンドが、タンパク質、天然リガンド、および合成リガンドからなる群より選択される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 49】

請求項 38 に記載の方法であって、ここで、前記リガンドが、抗体、抗体フラグメント、ペプチド、ポリペプチド、糖ペプチド、可溶レセプター、ステロイド、ホルモン、マイトジェン、抗原、リガンド、スーパー抗原、増殖因子、サイトカイン、レクチン、およびケモカインからなる群より選択される、方法。

10

【請求項 50】

少なくとも 1 つのリガンドが、抗体または抗体フラグメントである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

少なくとも 2 つのリガンドが、抗体または抗体フラグメントである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 52】

少なくとも 2 つのリガンドが存在し、そしてそれらが異なる抗体または抗体フラグメントである、請求項 49 に記載の方法。

20

【請求項 53】

少なくとも 1 つのリガンドが、抗 CD3 抗体、抗 CD2 抗体、または抗 CD3 抗体もしくは抗 CD2 抗体の抗体フラグメントである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 54】

少なくとも 1 つのリガンドが、抗 CD28 抗体またはその抗体フラグメントである、請求項 49 または 53 のいずれかに記載の方法。

【請求項 55】

少なくとも 1 つのリガンドが、CD28 に対する天然のリガンドである、請求項 49 または 53 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 56】

前記天然リガンドが、B7-1 または B7-2 を含む、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

前記力が、重力より大きい力、水力、膜透過圧によって生成される濾過力、遠心力、および磁力からなる群より選択される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 58】

前記磁力が、磁石によって生成され、該磁石は、該磁石の表面で約 200 ガウスと約 12,000 ガウスとの間の範囲の磁場強度を有する、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記表面が、常磁性粒子の表面である、請求項 38 に記載の方法。

40

【請求項 60】

前記表面への前記リガンドの結合が、共有結合、非共有結合、静電気結合、または疎水結合である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 61】

工程 (d) の前または工程 (d) と同時に、非濃縮細胞から、表面を用いて濃縮された T 細胞を分離する工程を包含する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 62】

インビボで T 細胞の活性化を誘導するために適用される方法であって、動物に常磁性粒子を提供する工程であって、該粒子が、T 細胞の活性化を誘導する T 細胞表面部分に対して特異的なリガンドを有し、該リガンドが該粒子に結合している、工程；該動物の別々の領

50

域に磁場を適用する工程；およびそれによって該別々の領域で該粒子に結合したT細胞の局在および活性化を誘導する工程、を包含する、方法。

【請求項63】

同時の標的細胞の濃縮および標的細胞表面部分の連結によって、標的細胞の集団を刺激するための方法であって、以下：

(a) 細胞の集団を提供する工程であって、該集団の少なくとも一部が標的細胞を含む、工程；

(b) 該細胞の集団を表面に接触させる工程であって、ここで、該表面が、該標的細胞の少なくとも一部の細胞表面部分を連結しかつ標的細胞の少なくとも該一部を刺激する1以上の因子を有し、該因子が該表面に結合している、工程；

(c) 標的細胞の濃縮および標的細胞表面部分の連結を優勢に駆動する力を適用し、それによって標的細胞の刺激を誘導する工程、を包含する、方法。

【請求項64】

請求項63に記載の方法であって、ここで、前記表面が、標的細胞の第1の細胞表面部分を連結する第1の因子を有し、該第1の因子が該表面に結合しており；そして該表面または第2の表面が、該標的細胞の第2の部分の連結する第2の因子を有し、該第2の因子が該表面または該第2の表面に結合しており、ここで、該連結が、該標的細胞のシグナル伝達を誘導する該第1および第2の因子による、方法。

【請求項65】

前記表面が、生体適合性である、請求項63に記載の方法。

【請求項66】

前記表面が、天然表面または合成表面である、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記表面が、ポリマーを含む、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

前記表面が、コラーゲン、精製タンパク質、精製ペプチド、多糖類、グリコサミノグリカン、および細胞外マトリックス構成物からなる群より選択される、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

前記多糖類が、キトサン、アルギナート、デキストラン、ヒアルロン酸、およびセルロースからなる群より選択される、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

請求項67に記載の方法であって、ここで、前記ポリマーが、ポリエステル、ポリエーテル、ポリ無水物、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン、ポリビニルアセテート、ブロックコポリマー、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、およびポリウレタンからなる群より選択される、方法。

【請求項71】

前記ポリマーが、乳酸を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記ポリマーが、コポリマーである、請求項67に記載の方法。

【請求項73】

前記コポリマーが、乳酸およびグリコール酸(PLGA)を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

前記生体適合性表面が、生分解性である、請求項65に記載の方法。

【請求項75】

前記生体適合性表面が、非生分解性である、請求項65に記載の方法。

【請求項76】

前記非生分解性物質が、ポリ（ジメチルシロキサン）およびポリ（エチレンービニルアセテート）からなる群より選択されるポリマーを含む、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

請求項 6 5 に記載の方法であって、ここで、前記生体適合性表面が、コラーゲン、金属、ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミネート、バイオセラミック材料、ヒアルロン酸ポリマー、アルギナート、アクリル酸エステルポリマー、乳酸ポリマー、グリコール酸ポリマー、乳酸／グリコール酸ポリマー、精製タンパク質、精製ペプチド、および細胞外マトリックス構成物からなる群より選択される、方法。

【請求項 7 8】

前記生体適合性表面が、移植可能なデバイスと結合される、請求項 6 5 に記載の方法。 10

【請求項 7 9】

前記デバイスが、ステント、カテーテル、繊維、中空繊維、パッチ、および縫合糸からなる群より選択される、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記表面が、ガラス、シリカ、シリコン、コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、ヒドロゲル、P T F E、ポリプロピレン、ポリスチレン、ナイロン、およびポリアクリルアミドからなる群より選択される、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記表面が、脂質、プレート、皿、袋、棒、ペレット、繊維、およびメッシュからなる群より選択される、請求項 6 6 に記載の方法。 20

【請求項 8 2】

前記表面が、粒子である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記粒子が、ビーズ、ミクロスフェア、ナノ粒子、およびコロイド粒子からなる群より選択される、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記ビーズが、直径約 5 ナノメートル～約 5 0 0 ミクロンである、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記因子が、タンパク質リガンド、天然リガンド、および合成リガンドからなる群より独立して選択される、請求項 6 3 に記載の方法。 30

【請求項 8 6】

請求項 8 5 に記載の方法であって、前記因子が、抗体、抗体フラグメント、ペプチド、ポリペプチド、糖ペプチド、レセプター、ステロイド、ホルモン、マイトジェン、抗原、スーパー抗原、増殖因子、サイトカイン、レクチン、ウイルスタンパク質、接着分子、およびケモカインからなる群より独立して選択される、方法。

【請求項 8 7】

少なくとも 1 つの因子が、抗体または抗体フラグメントである、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

第 1 の因子が、抗体または抗体フラグメントであり、そして第 2 の因子が、抗体または抗体フラグメントである、請求項 8 6 に記載の方法。 40

【請求項 8 9】

前記第 1 の因子および前記第 2 の因子が、異なる抗体または抗体フラグメントである、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記力が、重力より大きい力、水力、遠心力、膜透過圧によって生成される濾過力、および磁力からなる群より選択される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記磁力が、磁石によって生成され、該磁石は、該磁石の表面で約 2 0 0 ガウスと約 1 2 50

、000ガウスとの間の範囲の磁場強度を有する、請求項32に記載の方法。

【請求項92】

前記表面が、常磁性粒子の表面である、請求項63に記載の方法。

【請求項93】

前記表面への前記因子の結合が、共有結合、非共有結合、静電気結合、または疎水結合である、請求項63に記載の方法。

【請求項94】

細胞表面部分の連結および標的細胞の濃縮による標的細胞の刺激のための方法であって、以下：

(a) 標的細胞を含む細胞集団を提供する工程；

10

(b) 該細胞集団を表面に接触させる工程であって、ここで、該表面は、細胞表面部分に対して特異的な1以上のリガンドを有し、該リガンドが該表面に結合している、工程；

(c) 標的細胞の濃縮および該表面上での該細胞の濃縮を駆動する力を適用する工程；および

(d) 所望の刺激を達成するために十分な期間、該細胞をインキュベートする工程、を包含する、方法。

【請求項95】

所望の刺激を達成するために十分な前記期間が、約1分～約30日である、請求項94に記載の方法。

【請求項96】

20

所望の刺激を達成するために十分な前記期間が、約1日～約5日である、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

前記表面が、生体適合性である、請求項94に記載の方法。

【請求項98】

前記表面が、天然の表面または合成表面である、請求項97に記載の方法。

【請求項99】

前記表面が、ガラス、シリカ、シリコン、コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、ヒドロゲル、PTFE、ポリプロピレン、ポリスチレン、ナイロン、デキストラン、およびポリアクリルアミドからなる群より選択される、請求項98に記載の方法。

30

【請求項100】

前記表面が、プレート、袋、皿、棒、ペレット、繊維、およびメッシュからなる群より選択される、請求項94に記載の方法。

【請求項101】

前記表面が、粒子である、請求項94に記載の方法。

【請求項102】

前記粒子が、ビーズ、ミクロスフェア、ナノ粒子、およびコロイド粒子からなる群より選択される、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

前記ビーズが、直径約5ナノメートル～約500ミクロンである、請求項102に記載の方法。

40

【請求項104】

前記リガンドが、タンパク質、天然リガンド、および合成リガンドからなる群より選択される、請求項94に記載の方法。

【請求項105】

請求項94に記載の方法であって、ここで、前記リガンドが、抗体、抗体フラグメント、ペプチド、ポリペプチド、糖ペプチド、レセプター、ステロイド、ホルモン、マイトジェン、抗原、リガンド、スーパー抗原、増殖因子、サイトカイン、レクチン、およびケモカインからなる群より選択される、方法。

【請求項106】

50

少なくとも1つのリガンドが、抗体または抗体フラグメントである、請求項105に記載の方法。

【請求項107】

少なくとも2つのリガンドが、抗体または抗体フラグメントである、請求項105に記載の方法。

【請求項108】

少なくとも2つのリガンドが存在し、そして異なる抗体または抗体フラグメントである、請求項105に記載の方法。

【請求項109】

前記標的細胞が、T細胞、B細胞、または幹細胞からなる群より選択される、請求項63または94のいずれかに記載の方法。 10

【請求項110】

前記力が、重力より大きい力、水力、膜透過圧によって生成される濾過力、遠心力、および磁力からなる群より選択される、請求項94に記載の方法。

【請求項111】

前記磁力が、磁石によって生成され、該磁石は、該磁石の表面で約200ガウスと約12,000ガウスとの間の範囲の磁場強度を有する、請求項110に記載の方法。

【請求項112】

前記表面が、常磁性粒子の表面である、請求項94に記載の方法。

【請求項113】 20

前記表面への前記リガンドの結合が、共有結合、非共有結合、静電気結合、または疎水結合である、請求項94に記載の方法。

【請求項114】

工程(d)の前または工程(d)と同時に、非濃縮細胞から、濃縮された標的細胞を分離する工程をさらに包含する、請求項94に記載の方法。

【請求項115】

インビボで標的細胞の刺激を誘導する方法であって：動物に常磁性粒子を提供する工程であって、該粒子は、標的細胞の刺激を誘導する標的細胞表面部分に対して特異的なリガンドを有し、該リガンドが該粒子に結合している、工程；該動物の別々の領域に磁場を適用する工程；およびそれによって該別々の領域で該粒子に結合した該標的細胞の局在化および刺激を誘導する工程、を包含する、方法。 30

【請求項116】

レセプターを保有する細胞においてレセプターの分極を誘導する方法であって、以下：

- a) 細胞集団を提供する工程；
 - b) 該細胞集団を固体表面に接触させる工程であって、ここで、該固体表面が、該細胞集団の少なくとも一部上に存在する細胞表面レセプターに対して特異的な1以上のリガンドを有し、該リガンドが該表面に結合している、工程；および
 - c) 細胞の濃縮および細胞表面レセプターの連結を駆動する力を適用する工程、
- を包含する、方法。

【請求項117】 40

細胞表面分子の凝集を誘導するための方法であって、以下：

- a) 標的細胞表面分子を有する細胞の集団を提供する工程；
 - b) 固体表面に該細胞の集団を接触させる工程であって、ここで、該固体表面が、少なくとも1つの標的細胞表面分子に対するリガンドを有し、該リガンドが該固体表面に結合している、工程；
 - c) 標的細胞表面分子の凝集を駆動する力を適用する工程、
- を包含する、方法。

【請求項118】

該細胞集団が、リンパ球を含む、請求項117に記載の方法。

【請求項119】

前記固体表面が、プレート、袋、皿、棒、ペレット、繊維、ミクロスフィア、およびビーズからなる群より選択される、請求項 1 1 6 または 1 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記リガンドが、抗体、天然リガンド、および合成リガンドからなる群より選択される、請求項 1 1 6 または 1 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記リガンドが、抗体、ペプチド、ポリペプチド、増殖因子、サイトカイン、またはケモカインを含む、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記力が、重力より大きい力、水力、膜透過圧によって生成される濾過力、遠心力、および磁力からなる群より選択される、請求項 1 1 6 または 1 1 7 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 1 2 3】

前記磁力が、磁石によって生成され、該磁石は、該磁石の表面で約 2 0 0 ガウスと約 1 2 , 0 0 0 ガウスとの間の範囲の磁場強度を有する、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記固体表面が、常磁性である、請求項 1 1 6 または 1 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記レセプター結合が、細胞性事象のダウンレギュレーションまたは抑制を導く、請求項 1 1 6 または 1 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記レセプター結合が、細胞性事象のアップレギュレーションまたは活性化を導く、請求項 1 1 6 または 1 1 7 のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 1 2 7】

前記細胞性事象が、レセプター媒介性シグナル伝達である、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記力が、細胞表面部分の濃縮または方向付けを駆動する、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

T 細胞の集団が増殖するように誘導するための方法であって、約 2 時間～約 9 日の間の期間、該 T 細胞を固体表面に接触させる工程であって、該固体表面が、該表面上に固定された第 1 の因子および第 2 の因子を有し、そしてここで、該第 1 の因子が活性化シグナルを提供し、かつ該第 2 の因子が該 T 細胞に対する同時刺激シグナルを提供する、工程、を包含する、方法。 30

【請求項 1 3 0】

前記期間が、約 2 時間と約 4 8 時間との間である、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記期間が、約 2 時間と約 1 2 時間との間である、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記期間が、約 2 日と約 8 日との間である、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記期間が、約 3 日と約 6 日との間である、請求項 1 2 9 に記載の方法。 40

【請求項 1 3 4】

前記第 1 の因子および前記第 2 の因子が、同じ固体表面上に固定される、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記固体表面が、平らな表面、不規則な表面、球状の表面からなる群より選択される、請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記固体表面が、ビーズである、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記不規則な固体表面が、可塑性の表面である、請求項 1 3 5 に記載の方法。 50

【請求項 1 3 8】

前記第 1 の因子が、C D 3 を結合する抗体または抗体フラグメントを含み、そして前記第 2 の因子が、C D 2 8 を結合する抗体または抗体フラグメントを含む、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

請求項 1 2 9 ～ 1 3 8 のいずれか 1 つに記載の方法によって生成された、T 細胞の集団。

【請求項 1 4 0】

請求項 1 3 9 に記載の T 細胞の集団および薬学的に受容可能な賦形剤を含む、組成物。

【請求項 1 4 1】

T 細胞の集団が増殖するように誘導するための方法であって、以下：

10

a. T 細胞をビーズ上に固定した第 1 の因子に接触させることによって該 T 細胞の集団を活性化する工程であって、ここで、該ビーズが約 2 0 ミクロンと約 1 ミリメートルとの間の直径を有する、工程；および

b. 該 T 細胞の表面上の補助分子を、該補助分子と結合する第 2 の因子で刺激し、それによって該 T 細胞の増殖を誘導する工程であって、ここで、該第 2 の因子が該ビーズ上に固定されている、工程、

を包含する、方法。

【請求項 1 4 2】

前記ビーズが、約 8 0 ミクロンと約 5 0 0 ミクロンとの間の直径を有する、請求項 1 4 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 4 3】

前記ビーズが、約 1 0 0 ミクロンと約 4 0 0 ミクロンとの間の直径を有する、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記ビーズが、約 2 5 0 ミクロンと約 3 0 0 ミクロンとの間の直径を有する、請求項 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記ビーズが、常磁性ビーズである、請求項 1 4 1 ～ 1 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

30

前記第 1 の因子が抗 C D 3 抗体を含み、そして前記第 2 の因子が抗 C D 2 8 抗体を含む、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記 T 細胞の集団が、ヘルパー T 細胞を含む、請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

濾過によって前記 T 細胞から前記ビーズを分離する工程をさらに含む、請求項 1 4 1 ～ 1 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記第 1 の因子が抗 C D 3 抗体を含み、そして前記第 2 の因子が抗 C D 2 8 抗体を含む、請求項 1 4 8 に記載の方法。

40

【請求項 1 5 0】

前記 T 細胞の集団が、ヘルパー T 細胞を含む、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

活性化 T 細胞の集団であって、ここで、該細胞の少なくとも部分集団が、刺激後約 1 日と約 4 日との間で C D 1 5 4 レベルがピークに達する表現型を有する、集団。

【請求項 1 5 2】

活性化 T 細胞の集団であって、ここで、該集団が約 6 0 % より多くの C D 4 ⁺ T 細胞を含む、集団。

【請求項 1 5 3】

活性化 T 細胞の集団であって、ここで、該集団が少なくとも約 7 0 % の C D 4 ⁺ T 細胞を

50

含む、集団。

【請求項 1 5 4】

活性化 T 細胞の集団であって、約 2 時間～約 9 日間の期間にわたって、抗 CD 3 抗体および抗 CD 2 8 抗体またはこれらのフラグメントとの接触によって増殖するように予め刺激された、集団。

【請求項 1 5 5】

前記接触の期間が、約 4 時間～約 8 日間である、請求項 1 5 4 に記載の集団。

【請求項 1 5 6】

前記接触の期間が、約 4 時間～約 8 日間である、請求項 1 5 4 に記載の集団。

【請求項 1 5 7】

活性化 T 細胞の集団であって、ここで、該 T 細胞が、約 2 時間～約 9 日間の間の期間にわたる固定された第 1 の因子および第 2 の因子との接触によって増殖するように予め誘導されており、ここで、該第 1 の因子が活性化シグナルを提供し、そして該第 2 の因子が該 T 細胞に対する同時刺激シグナルを提供する、集団。

10

【請求項 1 5 8】

前記 T 細胞が、一次シグナルおよび二次シグナルの活性化後、約 2 日と約 7 日との間にピークのインターロイキン-4 レベルを生じる、請求項 1 5 7 に記載の集団。

【請求項 1 5 9】

前記 T 細胞が、一次シグナルおよび二次シグナルの活性化後、約 2 日と約 7 日との間にピークのインターロイキン-2 レベルを生じる、請求項 1 5 7 に記載の集団。

20

【請求項 1 6 0】

前記 T 細胞が、一次シグナルおよび二次シグナルの活性化後、約 2 日と約 7 日との間にピークの腫瘍壊死因子- α レベルまたはインターロイキン- γ レベルを生じる、請求項 1 5 7 に記載の集団。

【請求項 1 6 1】

請求項 1 5 1～1 6 0 のいずれか 1 項に記載の T 細胞および薬学的に受容可能な賦形剤を含む、組成物。

【請求項 1 6 2】

T 細胞および単球を含む懸濁物から単球を除去するための方法であって、該懸濁物を常磁性ビーズに接触させる工程であって、ここで、該ビーズが約 $2.8 \mu\text{m}$ と約 $1.0 \mu\text{m}$ との間の直径を有する、工程、およびその後、磁気引力によって該懸濁物から該単球を分離する工程、

30

を包含する、方法。

【請求項 1 6 3】

前記懸濁物が、全血球懸濁物である、請求項 1 6 2 に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

前記ビーズが、該ビーズに結合した少なくとも 1 つの抗体を有する、請求項 1 6 2 および 1 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

前記抗体が、非特異的抗体である、請求項 1 6 4 に記載の方法。

40

【請求項 1 6 6】

患者において腫瘍を処置する方法であって、該患者に、請求項 1 6 1 に記載の薬学的組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 1 6 7】

前記患者が、投与の前に内在性のリンパ球を除去される、請求項 1 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 6 8】

前記 T 細胞が、活性化前の前記患者由来である、請求項 1 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 6 9】

前記 T 細胞集団が、単球を除去される、請求項 1 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 7 0】

50

刺激されたT細胞の集団であって、該集団が、同時の濃縮および刺激の非存在下で抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激されたT細胞よりも、少なくとも10%高いCD154発現レベルを有し、ここで、該レベルが、T細胞の刺激後1~4日の間にフローサイトメトリーによって決定される、集団。

【請求項171】

刺激されたT細胞の集団であって、該集団が、同時の濃縮および刺激の非存在下で抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激されたT細胞よりも、少なくとも10%高いCD25発現レベルを有し、ここで、該レベルが、T細胞の刺激後1~4日の間にフローサイトメトリーによって決定される、集団。

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

(技術分野)

本発明は、一般的には細胞を刺激するための方法、より詳細にはこのような細胞の刺激を最大化するよう細胞を濃縮および刺激する方法に関する。本発明はまた、特異的な表現型の特性を有する刺激されたT細胞を含む、細胞の組成物に関する。

【0002】

(発明の背景)

多くの細胞は、細胞表層膜に見出される脂質のいかだに組込まれたレセプターを介して活性化または調節される。例えば、K. Simons and D. Toomre, Nature Rev. 1:31, 2000を参照のこと。脂質のいかだは、リガンドの結合により活性化される個々のレセプターのための濃縮プラットフォーム (concentrating platform) を形成する。脂質のいかだは、アレルギー性免疫応答時の免疫グロブリンEのシグナリング、神経系の発達および維持に重要なグリア細胞由来の神経栄養因子のシグナリング、多くのシグナル伝達プロセスの中心であるRasシグナリング、およびT細胞抗原レセプター (TCR) のシグナリングを含む、細胞のシグナリングプロセスに関与される。

20

【0003】

T細胞抗原レセプター (TCR) は、CD3複合体と会合し、そして抗原提示細胞 (APC) の表面上の主要組織適合複合体 (MHC) クラスIおよびクラスIIタンパク質により提示されるペプチドに結合する、多サブユニット免疫認識レセプターである。APC上の抗原ペプチドへのTCRの結合は、T細胞活性化の中心的な現象であり、T細胞とAPCとの接触点で免疫学的な接合 (synapse) を生じる。さらにデータは、脂質のいかだのクラスター化が、この免疫学的な接合の形成に必須であることを示唆する。Krawczyk et al., Immunity 13(4):463-73, 2000。

30

【0004】

T細胞の活性化を維持するために、代表的にTリンパ球は、第2の同時刺激シグナルを必要とする。代表的に同時刺激は、Tヘルパー細胞がクローンの増殖を誘導する十分なサイトカインレベルを産生するために必要である。Bretscher, Immunol. Today 13:74, 1992; June et al., Immunol. Today 15:321, 1994。主要な同時刺激シグナルは、活性化された抗原提示細胞 (APC) 上のB7ファミリーリガンドのメンバー (CD80 (B7.1) またはCD86 (B7.2)) が、T細胞上のCD28に結合する場合に生じる。

40

【0005】

T細胞の特定のサブセットの増殖を刺激する方法は、免疫療法において有用な種々のT細胞組成物を生じる可能性を有する。成功した免疫療法は、効果的な刺激によるT細胞の反応性および量の増大により補助され得る。

【0006】

ヒトT細胞を増殖するために利用可能な種々の技術は、アクセサリ細胞および/または外因性の増殖因子 (例えば、インターロイキン-2 (IL-2)) の使用に主に依存する。IL-2は、抗CD3抗体と共に使用されて、T細胞増殖を刺激し、T細胞のCD8⁺

50

亜集団を優勢に増殖させる。両方のAPCシグナルは、最適なT細胞の活性化、増殖、および再注入の際のT細胞の長期の生存のために必要であると考えられる。APCは比較的単命なので、アクセサリ細胞としてのMHC適合性APCに対する要求は、長期の培養系に重要な問題を示す。従って、長期の培養系において、APCは、耐えず供給源から獲得され、補充されなければならない。アクセサリ細胞の継続的な供給の必要性は、アクセサリ細胞が影響される免疫不全の処置にとって問題となる。さらに、ウイルス感染の処置の際、アクセサリ細胞がウイルスを保有する場合、この細胞は、長期の培養中に全体的なT細胞集団に混入し得る。

【0007】

外因性の増殖因子またはアクセサリ細胞の非存在下で、同時刺激シグナルは、例えば、
固体相表面（例えば、ビーズ）に取り付けられたCD3リガンドおよびCD28リガンド
に細胞を曝すことによりT細胞集団に送達され得る（C. June, et al. (米国
特許第5, 858, 358号)；C. June et al. WO99/953823を
参照のこと）。これらの方法は、治療的に有用なT細胞集団を達成し得るが、T細胞調製
の増加した粗暴さおよび容易さは、理想よりも低いままである。

【0008】

さらに、当該分野で現在利用可能な方法は、T細胞の短期の増殖またはより粗暴なT細胞
集団の獲得およびそれらの有益な結果ならびに／もしくは特定のT細胞亜集団／表現型の
増殖に焦点を合わされていない。さらに、増殖されたT細胞の適用性は、いくつかの疾患
状態のみに限定される。インビボでの最大の有効性にとって、理論的に、エキソビボまた
はインビボで生成された、活性化されたT細胞集団は、癌、感染疾患、または他の疾患状
態に対する免疫応答と最大限に組合わせ得る状態にあるべきである。本発明は、他の増殖
方法よりも健常的で天然であると思われる表面レセプターおよびサイトカイン産生特性を
有する、増加した数の、より高度に活性化され、より純粋なT細胞を生成する方法を提供
する。

【0009】

さらに、本発明は、T細胞集団および同一物を産生するため、および他の関連する利点を
提供するためのパラメータを含む、任意の標的細胞の表現型が変更された細胞集団の組成
物を提供する。

【0010】

（発明の要旨）

本発明は、一般的には細胞を刺激するための方法を提供し、より詳細にはこのような細胞
の刺激を最大化するよう細胞を濃縮および刺激する新規の方法に関する。1つの局面にお
いて、本発明は、同時のT細胞濃縮および細胞表面部分の連結により、T細胞の集団を刺
激するための方法を提供する。この方法は、細胞集団を提供する工程を包含し、ここで、
少なくともその一部がT細胞を含み、細胞の集団と表面を接触させ、ここで、この表面が
、少なくともT細胞の表面部分の一部と連結される1つ以上の因子に取付けられており、
そして少なくとも一部のT細胞またはその亜集団のその部分を刺激し、そして優勢にT細
胞の濃縮およびT細胞表面部分の連結を駆動する力を適用し、それによってT細胞の刺激
を誘導する。

【0011】

本発明の1つの実施形態において、この表面は、T細胞の第1の細胞表面部分に連結する
第1の因子に取り付けられており；そして同一および第2の表面は、上記T細胞の第2の部
分に連結する第2の因子に取り付けられており、ここで、第1および第2の因子による上
記連結は、上記T細胞の増殖を誘導する。関連する実施形態において、この表面は、生物
適合性、天然または合成であり得、ポリマーを含み、コラーゲン、精製されたタンパク質
、精製されたペプチド、多糖類、グリコサミノグリカン、または細胞外マトリクス組成物
を含む。特定の実施形態において、この多糖類は、キトサン、アルギネート、デキストラ
ン、ヒアルロン酸（hyaluronic acid）、およびセルロースから選択され
、そしてこのポリマーは、ポリスチレン、ポリエステル、ポリエーテル、ポリ無水物、ポ

リアルキルシアノアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン (polyphosphazene)、ポリビニルアセテート、ブロックコポリマー、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)、またはポリウレタンから選択される。さらに他の実施形態において、このポリマーは、乳酸またはコポリマーを含み得る。なおさらに他の実施形態において、このポリマーはコポリマーであり得る。このようなコポリマーは、種々の公知のコポリマーであり得、そして乳酸および／またはグリコール酸 (PLGA) を含み得る。

【0012】

生物適合性の表面に関して、このような表面は、生物分解性または非生物分解性であり得る。関連の実施形態において、限定されないが、非生物分解性の表面は、ポリ (ジメチルシロキサン) および／またはポリ (エチレンービニルアセテート) を含み得る。さらに生物適合性の表面は、限定されないが、コラーゲン、金属、ヒドロキシアパタイト、ガラス、アルミネート、バイオセラミック物質、ヒアルロン酸ポリマー、アルギネート、アクリルエステルポリマー、乳酸ポリマー、グリコール酸ポリマー、乳酸／グリコール酸ポリマー、精製されたタンパク質、精製されたペプチド、および／または細胞外マトリクス組成物を含み得る。

10

【0013】

なおさらにさらなる実施形態において、この生物適合性表面は、移殖可能なデバイスと連結される。この移殖可能なデバイスは、用いられることが所望されるいずれかであり得、そしてステント、カテーテル、繊維、中空繊維、パッチ、または縫合糸を含み得る。関連する実施形態において、この表面は、ガラス、シリカ、ケイ素、コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、ヒドロゲル、PTFE、ポリプロピレン、ポリスチレン、ナイロン、またはポリアクリルアミドであり得る。なおさらなる実施形態において、この表面は、脂質、メッキ、バッグ、ロッド、ペレット、繊維またはメッシュを含む。他の実施形態において、この表面が、粒子であり、そしてさらにこの粒子がビーズ、微粒子、ナノ粒子、またはコロイド粒子を含む。粒子およびビーズの大きさはまた選択され得、そしてこのビーズが直径約5ナノメートルから約500ミクロンである、種々の大きさを有し得る。

20

【0014】

他の実施形態において、この方法で使用される因子は、タンパク質リガンド、天然リガンド、または合成リガンドから独立して選択され得る。さらに、この因子としてはまた、抗体、抗体フラグメント、ペプチド、ポリペプチド、糖ペプチド、可溶性レセプター、ステロイド、ホルモン、分裂促進因子、抗原、スーパー抗原、増殖因子、サイトカイン、レクチン、ウイルスタンパク質、接着分子、またはケモカインを含む。特定の実施形態において、少なくとも1つの因子が、抗体または抗体フラグメントである。これに対して、なお他の実施形態において、第1の因子は、抗体およびそのフラグメントであり、そして、第2の因子は、抗体またはそのフラグメントである。第1の因子および第2の因子は、同じまたは異なる抗体のいずれかであり得ることがもちろん理解される。

30

【0015】

選択された実施形態において、第1の因子は、抗CD3抗体、抗CD2抗体、または抗CD3抗体もしくは抗CD2抗体の抗体フラグメントである。さらに選択された実施形態は、第2の因子が、抗CD28抗体またはその抗体フラグメントである実施形態を含む。さらなる実施形態は、第2の因子が、CD28 (例えば、B7-1またはB7-2のような) についての天然リガンドを含む実施形態を含む。さらに、他の刺激性因子が使用され得る。

40

【0016】

特定の実施形態において、細胞を駆動するために使用される力は、類似して機能する種々の力を含み得、そして、重力、水力、膜貫通圧力によって生成される過力、遠心力、または磁力より大きい力を含み得る。磁力が使用される場合、いくつかの実施形態は、磁石の表面において、約200ガウスから約12,000の間で変化する磁場強度を有する磁石によって生成される磁力を利用する。

50

【0017】

別の実施形態は、その表面が、常磁性粒子の表面である表面を含む。これに対して、常磁性粒子の表面を含む表面を利用する実施形態において、表面への因子の接着は、共有結合性、非共有結合性、静電氣的、分子間接着、または疎水性結合であり得る。

【0018】

さらになお別の実施形態は、リガンドであるT細胞は、結合されていないT細胞から分離された。これに対して、他の実施形態において、T細胞は、免疫応答障害を改善する。

【0019】

上記の実施形態と組み合わせられ得る他の局面は、例えば、同時の細胞表面部分の結合およびT細胞凝集によって、T細胞を刺激するための方法を含み、この方法は、以下の工程を包含する：T細胞を含む細胞集団を提供する工程、この細胞集団を表面と接触させる工程であって、この表面が、そこへ細胞表面部分について特異的な1つ以上のリガンドを接着する工程、T細胞および表面の濃縮を駆動する力を適用する工程、ならびに所望の刺激を達成するために十分な期間、この細胞をインキュベートする工程。関連した実施形態において、所望の刺激を達成するために十分な時間は、1分から10日まで、そしてその間の全ての整数値で変化し得る。特定の実施形態において、この時間範囲は、約1日から約8日まで変化し得るが、なお他の実施形態において、時間範囲は、約3日から5日まで、または約1日から5日までであり得る。関連した実施形態において、インキュベーション温度は、約2から38℃まで変化し得る。

【0020】

全ての記載された方法を用いて使用され得るさらなる実施形態は、表面が、ガラス、シリカ、シリコン、コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、ヒドロゲル、PTFE、ポリプロピレン、ポリスチレン、ナイロン、デキストラン、またはポリアクリルアミド、またはこれらの任意の混合物から選択される場合を含む。さらに、実施形態は、上記に示される任意の工程を用いる前または同時に、非濃縮細胞から表面を有するT細胞濃縮物を分離する工程を包含する。

【0021】

他の局面において、インビボでT細胞活性化を誘導する方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：動物に常磁性粒子を提供する工程であって、この粒子が、そこへT細胞活性化を誘導するT細胞表面部分に特異的なリガンドを接着する工程；動物の別々の領域に磁場を適用する工程；ならびにそれにより、この別々の領域でこの粒子に結合されたT細胞の局在化および活性化を誘導する工程。

【0022】

同時の標的細胞濃縮および標的細胞部分の連結によって、標的細胞の集団を刺激するための方法を含む、さらなる局面が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：細胞の集団を提供する工程であって、その少なくとも一部が標的細胞を含む工程、この細胞の集団を表面と接触させる工程であって、この表面が、そこへこの標的細胞少なくとも一部の細胞表面部分を連結し、そして標的細胞の少なくともこの一部を刺激する1つ以上の因子を接着させる工程、標的細胞の濃縮および標的細胞の表面部分の連結を主に駆動する力を適用し、それにより標的細胞の刺激を誘導する工程。

【0023】

特定の実施形態において、本明細書中に記載される方法は、そこへ標的細胞の第1の細胞表面部分と結合する第1の因子が接着された表面を利用する；そして、同じまたは第2の表面が、この標的細胞の第2の部分と結合する第2の因子に結合され、ここで、第1の因子および第2の因子によるこの結合が、この標的細胞においてシグナル伝達を誘導する。

【0024】

以前に述べられたように、表面は、コラーゲン、精製タンパク質、精製ペプチド、多糖類、グリコサミノグリカン、および／または細胞外マトリクス組成物を含む、種々の成分を含む。特定の実施形態において利用されるいくつかの多糖類としては、キトサン、アルギナート、デキストラン、ヒアルロン酸、および／またはセルロースが挙げられ得る。さら

に、上記および全ての方法に適用可能であるポリマーは、ポリエステル、ポリエーテル、ポリ無水物、ポリアルキルシアノアシレート、ポリアクリルアミド、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン、ポリビニルアセテート、ブロックコポリマー、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、および／またはポリウレタンならびにそれらの混合物から選択され得る。

【0025】

他の局面において、細胞表面部分の結合および標的細胞の濃縮によって、標的細胞を刺激するための方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：標的細胞を含む細胞集団を提供する工程、この細胞集団を表面と接触させる工程であって、この表面が、そこへ細胞表面部分についての1つ以上のリガンドを接着する工程、標的細胞の濃縮およびこの表面のこの細胞の濃縮を駆動する力を適用する工程、ならびに所望の刺激を達成するのに十分な期間、この細胞をインキュベートする工程。

10

【0026】

関連した実施形態において、標的細胞は、T細胞、B細胞、または幹細胞であり得る。

【0027】

他の局面は、インビボで標的細胞刺激を誘導する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：常磁性粒子を動物に提供する工程であって、この粒子が、そこへ標的細胞刺激を誘導する標的細胞表面部分について特異的なリガンドを接着する工程；動物の別々の領域に磁場を適用する工程；ならびにそれにより、この別々の領域でこの粒子に結合された標的細胞の局在化および刺激を誘導する工程。

20

【0028】

レセプター保有細胞におけるレセプター分極を誘導する方法を含む、なお他の局面が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：細胞集団を提供する工程、この細胞集団を固体表面と接触させる工程であって、この固体表面が、そこへこの細胞集団の少なくとも一部に存在する細胞表面レセプターに特異的な1つ以上のリガンドを接着する工程、ならびに細胞濃縮および細胞表面レセプター結合を駆動する力を適用する工程。

【0029】

他の局面は、細胞表面分子の凝集を誘導するための方法を含み、この工程は、以下の工程を包含する：標的細胞表面分子を有する細胞の集団を提供する工程、この細胞の集団と固体表面を接触させる工程であって、この固体表面が、そこへ少なくとも1つの標的細胞表面分子についてのリガンドを接着する工程、ならびに標的化された細胞表面分子の凝集を駆動する力を適用する工程。

30

【0030】

特定の実施形態において、細胞集団は、リンパ球を含む。

【0031】

なお他の特定の実施形態において、レセプターまたは細胞表面部分の結合は、細胞性事象のダウンレギュレーションまたは抑制を導く。関連した実施形態は、レセプター結合が、細胞性事象のアプレギュレーションまたは活性化を導く実施形態を含み、これは、例えば、レセプター媒介性シグナル伝達を含み得る。

【0032】

本発明の別の実施形態は、細胞表面部分の濃縮または配向を駆動する力の使用を想定する。

40

【0033】

本発明のなおさらなる実施形態は、テイラード標的細胞集団および／またはT細胞組成物を含む組成物を表現型的に提供する。さらに、細胞表面部分と結合することによって、このような細胞を活性化するための方法が提供される。T細胞集団が増殖するのを誘導するための方法がさらに提供され、この方法は、約2時間と約9日の間の期間、T細胞を固体表面と接触させる工程であって、固体表面が、その上に第1の因子および第2の因子を固定化し、第1の因子が、活性化シグナルを提供し、そして第2の因子がこのT細胞に同時刺激性シグナルを提供する工程を包含する。

50

【0034】

本発明のこれらおよび他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照する際に明らかとなる。

【0035】

(発明の詳細な説明)

本発明を述べる前に、本明細書中以下で使用される特定の用語の定義を示すことは、本発明の理解の一助となり得る。

【0036】

本明細書中で使用される場合、用語「生物適合性」は生存細胞に対して主に無毒である特性を言う。

10

【0037】

本明細書中で使用される場合、用語「刺激」は、細胞表面部分の連結によって誘導される一次応答を言う。例えば、レセプターの状況において、このような刺激は、レセプターの連結および引続くシグナル伝達事象を伴う。T細胞の刺激に関して、このような刺激は、T細胞表面部分の連結を言い、このことは1つの実施形態において次のシグナル伝達事象（例えば、TCR/CD3複合体の結合）を誘導する。さらに、刺激事象は細胞を活性化し得、そして分子の発現もしくは分泌をアップレギュレーションまたはダウンレギュレーション（例えば、TGF- β のダウンレギュレーション）し得る。従って、細胞表面部分の連結は、直接的なシグナル伝達事象がない場合においてさえも、細胞骨格構造または細胞表面部分の付着（そのそれぞれは、引続く細胞応答を増強、改変、または変化するために役立ち得る）の再構築を生じ得る。

20

【0038】

本明細書中で使用される場合、用語「活性化」は、顕著な形態学的変化を誘導するために十分な細胞表面部分の連結に続く細胞の状態を言う。T細胞表面の状況において、このような活性化は細胞増殖を誘導するために十分に刺激されたT細胞の状態を言う。T細胞の活性化はまた、サイトカイン産生および調節性または細胞溶解性エフェクター機能の実施を誘導し得る。他の細胞の状況において、この用語は、特定の物理的・化学的プロセスのアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションのいずれかを推論する。

【0039】

本明細書中で使用される場合、用語「力」は刺激されるべき細胞に適用される人工的な力または外部の力を言い、これは細胞濃縮および細胞表面部分に結合する因子を有する細胞の濃縮を誘導する。例えば、用語「力」として、細胞濃縮および/または細胞表面部分の連結を誘導する重力よりも大きな任意の力（すなわち、重力に加えて、および重力の力のみではない）が挙げられる。このような力として、濾過のような細胞内外圧、水力、電気的力、音の力、遠心力、または磁力が挙げられる。理想的には、使用される力は、細胞表面部分に連結する因子での目的の標的細胞の濃縮を誘導する。種々の状況において、この力はパルスされ得る（すなわち、適用、再適用（例えば、磁力を消し、そして磁力をかけ得、それを常磁性粒子と組合せて細胞集団をパルスする））。

30

【0040】

本明細書中で使用される場合、用語「同時に」は、細胞表面部分に付着される因子を結合する細胞表面部分を有する表面で細胞を固有に濃縮するという事実が、お互いにおよび細胞表面（従って、リガンド）に濃縮を生じることを言う。しかし、用語「同時に」の使用は、濃縮および濃縮表面で同時に生じるさらなるリガンドの結合のように、細胞表面に付着される因子を結合する細胞表面部分を有する表面と標的細胞の前もっての結合を防止しない。例えば、T細胞活性化の状況において、T細胞は、細胞表面に付着される抗CD3抗体および抗CD28抗体を有する常磁性ビーズのような表面に曝露され得、そして磁性領域によって同時に濃縮される。従って、この状況において、細胞およびビーズが前もっての接触および連結を有するにも関わらず、細胞濃縮の間にさらなる連結が生じる。

40

【0041】

本明細書中で使用される場合、用語「標的細胞」は、細胞表面部分の連結によって刺激さ

50

れることを意図される任意の細胞を言う。

【0042】

本明細書中で使用される場合、「抗体」として以下が挙げられる：ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方；霊長類化（*primate*）（例えば、ヒト化（*humanized*））；マウス；マウスーヒト；マウスー霊長類；およびキメラ；ならびにインタクトな分子、それらのフラグメント（例えば、*scFv*、*Fv*、*Fd*、*Fab*、*Fab'* および *F(ab)'*₂ フラグメント）、もしくはインタクトな分子および／またはフラグメントのマルチマーまたは凝集物であり得；そして天然に存在し得るか、または例えば、免疫化、合成または遺伝的操作によって生成され得；本明細書中で使用される場合、「抗体フラグメント」は、抗体に由来するか、または抗体に関連するフラグメントを言い、これらは抗原に結合し、そしていくつかの実施形態において、クリアランスおよび取り込みを容易にする構造的な特徴を示すために誘導化され得る（例えば、ガラクトース残基の組込みによって）。これは、例えば、*F(ab)*、*F(ab)'*₂、*scFv*、軽鎖可変領域（*V_L*）、重鎖可変領域（*V_H*）、およびこれらの組合せを含む。

10

【0043】

本明細書中で使用される場合、用語「タンパク質」として、タンパク質、ポリペプチド、およびペプチドが挙げられ；インタクトな分子、それらのフラグメント、もしくはインタクトな分子および／またはフラグメントのマルチマーあるいは凝集物であり得；そして天然に存在し得るか、もしくは例えば、合成（化学的および／または酵素的を含む）または遺伝的操作によって産生され得る。

20

【0044】

本明細書中で使用される場合、用語「因子」、「リガンド」、または「細胞表面部分に結合する因子」は、規定された細胞集団に結合する分子を言う。この因子は、レセプター、抗原性決定基、または標的細胞集団上に存在する他の結合部位のような任意の細胞部分に結合し得る。この因子は、タンパク質、ペプチド、抗体およびそれら抗体のフラグメント、融合タンパク質、合成分子、有機分子（例えば、低分子）などであり得る。本明細書中およびT細胞刺激の状況において、抗体は、このような因子のプロトタイプの例として使用される。

【0045】

本明細書中で使用される場合、用語「細胞表面部分に結合する因子」および「細胞表面部分」は、リガンド／抗リガンド対の状況において使用される。従って、これらの分子は、一般的に相対的に高い親和性の特異的結合を示す相補性分子／抗相補性分子セットとして考えられるべきである。

30

【0046】

本明細書中で使用される場合、「同時刺激性シグナル」は、一次シグナルとの組合せ（例えば、*TCR*／*CD3*の連結）のシグナルを言い、T細胞増殖を引き起こす。

【0047】

本明細書中で使用される場合、「リガンド／抗リガンド対」は、一般的に相対的に高い親和性の特異的結合を示す相補性分子／抗相補性分子のセットを言う。例示的に、リガンド／抗リガンド対、酵素／インヒビター、ハプテン／抗体、レクチン／炭水化物、リガンド／レセプター、およびビオチン／アビジンまたはストレプトアビジン。本発明の状況において、特定のレセプターおよび他の細胞表面部分は、抗リガンドであるが、細胞表面と反応性の因子（例えば、抗体および抗体フラグメント）は、リガンドと考えられる。

40

【0048】

本明細書中で使用される場合、「分離」は、1つの成分を別の成分から（例えば、濾過または磁性誘引によって）実質的に精製する任意の手段を含む。

【0049】

本明細書中で使用される場合、「静止状態の」は、細胞が活動的に増殖していない細胞状態を言う。

【0050】

50

本明細書中で使用される場合、「表面」は、細胞表面に付着される因子を有し得る任意の表面を言い、限定ではないが、金属、ガラス、プラスチック、コポリマー、コロイド、脂質、細胞表面などが挙げられる。基本的に任意の表面は、差異病表面に結合されるか、または付着される因子を残し得る。

【0051】

本発明の1つの局面は、細胞の濃縮を誘導する力と細胞表面部分の連結との組合せが、これらの細胞の刺激の顕著な増大を生じるという驚くべき発見に関する。本明細書中に示されるプロトタイプの場合では、T細胞が用いられる。しかし、当業者は、本発明が、細胞表面部分の連結または凝集が所望されるか、またはこのような結合が引き続いての細胞シグナル伝達事象を引き起こす任意の細胞型（例えば、レセプター）に対する広範な適用性を有することを容易に推論する。理論に捕らわれることなく、本発明は、脂質ラフティング（*rafting*）および／またはレセプター分極化を伴う現象の利点を得ることにより、機能し得る。これらの現象は、細胞表面部分を含む脂質ラフト（*raft*）の凝集によるシグナル伝達の開始／増大か、あるいは細胞の1つまたは数個所の領域でのレセプターの局在化（すなわち、分極化）に起因する増大したシグナル伝達のいずれかを示唆することで類似している。従って、このような細胞表面部分の連結は、T細胞における強い細胞活性化および増殖を予想外に引き起こすのみならず、多くの細胞型のシグナル伝達事象を拡大するために適用され得る。従って、本発明は、身体内の特定の位置におけるシグナル伝達事象を誘導するために、移植可能なデバイスと組合せて用いられ得、患者への引き続いての注入のために細胞をエキソビボで刺激するために用いられ得、そしてシグナル伝達のシグナルを増幅することにより細胞内のシグナル伝達事象の研究を実質的に向上させるために用いられ得、それにより、このような伝達事象に影響を与える薬物（例えば、精神分裂病、睡眠、および他の神経学的兆候に関するG共役型タンパク質レセプター；アレルギー応答に関する肥満細胞および好塩基球上のFcフラグメントレセプター）をスクリーニングする際に補助をする。従って、T細胞に関して、本発明は、以下の種々の予想外の利点を提供する：初めに、本発明は、「非コーティング」粒子を用いる別個の単球除去工程の必要性を排除し、より少ない細胞移入およびより少ない試薬、活性化工程の間のT細胞活性化の増加したレベル、細胞のプロセッシングに関する時間および労力の減少を必要とすることにより、T細胞の増殖を単純化し、製造の費用を削減し、そして患者の処置および注入を計画する際の自由度を増す。

【0052】

本発明のさらなる局面では、第1および第2以上の表面は、表面に結合したリガンド／因子を伴ってか、または伴わずに利用される。この実施形態では、種々の表面は、標的細胞の細胞表面部分を結合するために、表面に付着させた、同じまたは異なる因子を有し得る。例えば、常磁性ビーズは、これらに付着され得、標的細胞上のレセプターに対する抗体およびこのようなビーズは、標的細胞を含む細胞の集団と共に混合され得る。さらに、細胞集団は、表面に付着した薬剤を結合する同じまたは異なる細胞部分を有する第2以上のビーズと混合され得る。力が濃縮を誘導した際に、ビーズおよび細胞は、類似した容量で合わせられ、シグナル伝達が増幅される。別の例では、糖質または表面に付着した他の非レセプター細胞表面部分を有する常磁性ビーズは、標的細胞を含む細胞の集団と混合される。次いで、磁場を用いて、細胞に付着したビーズを、別の表面に付着したレセプター連結因子を有する別の表面へと引き付ける。従って、シグナル伝達を誘導する因子は、第2の表面上にある。なおさらなる別の例では、標的細胞の細胞表面部分を結合する薬剤は、メッシュまたはフィルター（これらは、それ自体がこれらに結合したリガンドを有し得る）に保持されるために十分に大きい粒子に付着され得る。

【0053】

上記のように、本発明は、細胞集団中の細胞の表面上の部分を、同時に濃縮および連結することにより、細胞集団を刺激するための方法を提供する。細胞集団を、細胞表面部分に結合するある因子（例えば、リガンド）と接触させることにより、細胞集団を刺激し得る。このリガンドは、溶液であってもよいが、また表面に付着させてもよい。レセプターの

ような細胞表面部分の連結は、一般に、特定のシグナル伝達経路を誘導し得る。最近の研究は、生じるシグナル伝達について、必要なレセプターを含む脂質ラフトの臨海濃縮物が凝集するはずであることを示唆する。例として、ラフトの凝集は、特定の細胞表面部分に対するリガンドを常磁性粒子へと付着させ、リガンド保有粒子を細胞に曝露させ、そして直後かまたは同時に力（例えば、連結した部分（例えば、レセプター）を分極化し、そして小さな容積に細胞を濃縮することを補助するための磁場）を加えることにより、インビボまたはインビトロで促進され得る。磁力の適用は、細胞を濃縮し、そして細胞表面部分を連結する、表面に付着した因子を有する表面を有する細胞を濃縮し、それにより細胞のリガンドとのより強い接触をもたらし、加速した活性化およびより強力な活性化を生じる。本発明の多くの適用が可能である（例えば、細胞が、少ない数のレセプターおよび／または機能不全のレセプターを有する場合、この方法は、脂質ラフトにおけるこのようなレセプターを十分に濃縮して、このような欠陥を克服し得、そして適切なシグナル伝達活性を可能にする）。このような細胞表面レパートリーの収集物の1つの例は、白血病の特定の型を有する患者にあり、ここで、因子（例えば、抗CD3および抗CD28抗体）を用いる細胞表面刺激の前では、いくつかの正常な細胞表面マーカー（例えば、CD3/TCR複合体）は、通常低い。抗CD3および抗CD28抗体のような因子を用いるこれらの細胞表面の刺激により、これらの細胞の細胞表面マーカーは、正常に見えるレベルに戻り、そして患者に戻される場合、癌治療のためのより強い産物を提供し得る。本発明のさらに他の適用では、細胞は、有効に濃縮および活性化（レセプター分極化を誘導することを含む）され得、それにより、レセプターシグナル伝達事象を最大にする。このような適用は、広範な有用性（レセプターで、または活性化を誘導する（例えば、Fasまたは腫瘍細胞における分子のようなものを連結することによりアポトーシスを誘導する）ために細胞の表面上の細胞ラフトを収集することによる、指向されるスクリーニングアッセイにおける用途を含む）を有する。

10

20

【0054】

このようなスクリーニングアッセイの1つの例では、G共役型タンパク質レセプター保有細胞を使用し得、そしてこれらの細胞を、細胞に結合する因子（これらの因子は、力が濃縮を誘導することを可能にする表面に結合している）と接触し得る。従って、レセプターと一緒にラフトする場合、シグナル伝達事象は増幅される。このことは、代表的な実験、従って、このようなシグナル伝達事象を阻害するかまたはいくらか改変するための薬物化合物物についてスクリーニングにおいて、非常に低いレベルである、シグナル伝達事象の研究に重要であり得る。

30

【0055】

（A. 細胞集団の刺激）

本発明の方法は、細胞事象を誘導する、細胞部分に結合するリガンドまたは因子を導入することによる標的細胞の刺激に関する。細胞に対するリガンドまたは因子の結合は、シグナル伝達経路を開始し得る。これは、次いで、細胞における特定の表現型変化または生物学的変化を活性化する。細胞の活性化は、正常な細胞機能を増強し得るか、または異常な細胞における正常な細胞機能を惹起し得る。本明細書中に記載される方法は、細胞表面部分を連結するリガンドまたは因子と共に細胞の濃縮を強制することによる刺激を提供する。細胞の刺激は、増強され得るか、または特定の細胞事象は、第2の細胞表面部分を連結する第2の因子またはリガンドを導入することにより刺激され得る。本発明は、細胞表面部分の連結がシグナル伝達事象を導く任意の細胞に適用され得る。本発明は、刺激した細胞を選択または培養するための手段をさらに提供する。記載されるプロトタイプ例は、T細胞の刺激であるが、当業者は、この方法が、他の細胞型に適用され得ることを容易に理解する。例として、刺激および選択され得る細胞型としては、線維芽細胞、神経芽細胞、造血幹細胞および造血前駆体細胞（CD34⁺細胞）、間葉幹細胞、樹状細胞、細胞溶解性T細胞（CD8⁺細胞）、他の白血球集団、多能性（pluripotent）幹細胞、多能性（multipotent）幹細胞、島細胞などが挙げられる。従って、本発明はまた、この方法論から生じる細胞の集団、ならびに特定の表現型特性を有するT細胞

40

50

胞を含む別々の表現型特性を有する細胞集団を提供する。

【0056】

上記のように、種々の細胞型が、本発明の状況下において利用され得る。例えば、B細胞、T細胞、NK細胞、他の血球、ニューロン細胞、腺（内分泌）細胞、骨形成細胞（破骨細胞など）、生殖細胞（例えば、卵母細胞）、生殖器官内面の上皮細胞などのような細胞型が利用され得る。細胞表面部分ーリガンド対としては、（排他的ではないが）以下が挙げられ得る：T細胞抗原レセプター（TCR）および抗CD3 mAb、TCRおよび主要組織適合遺伝子複合体（MHC）＋抗原、TCRおよびスーパー抗原（例えば、ブドウ球菌エンテロトキシンB（SEB）、トキシックショック症候群毒素（TSST）など）、B細胞抗原レセプター（BCR）および抗Ig、BCRおよびLPS、BCRおよび特異的抗原（一価または多価）、NKレセプターおよび抗NKレセプター抗体、FAS（CD95）レセプターおよびFASリガンド、FASレセプターおよび抗FAS抗体、CD54および抗CD54抗体、CD2および抗CD2抗体、CD2およびLFA-3（リンパ球機能関連抗原-3）、サイトカインレセプターおよびその個々のサイトカイン、サイトカインレセプターおよび抗サイトカインレセプター抗体、TNF-R（腫瘍壊死因子レセプター）ファミリーメンバーおよびそれに対して指向された抗体、TNF-Rファミリーメンバーおよびその個々のリガンド、接着／ホーミングレセプターおよびそのリガンド、接着／ホーミングレセプターおよびそれに対する抗体、卵母細胞または受精卵母細胞のレセプターおよびそのリガンド、卵母細胞または受精卵母細胞のレセプターおよびそれに対する抗体、子宮の子宮内膜内面上のレセプターおよびそのリガンド、ホルモンレセプターおよびその個々のホルモン、ホルモンレセプターおよびそれに対して指向された抗体など。

【0057】

リガンドによるレセプターの結合の性質は、レセプターの多量体化、またはレセプターの凝集／配向付けのいずれかを引き起こし、その結果、シグナル伝達または細胞応答が加速されるか、改善されるか、さもなければ改変されて特定の利点（例えば、細胞分裂、サイトカイン分泌、細胞移動、細胞－細胞相互作用の増加など）を付与する。

【0058】

2つの例を、以下に示す。これらの例は、このような細胞表面部分の多量体化、凝集または制御された再配向付けが、いかに実用的に有益であり得るかを示す。

【0059】

1つの例では、抗原および抗原提示細胞による正常なT細胞活性化が、通常、TCRラフト（TCR raft）の凝集、細胞骨格再構築、「活性化」シグナルの分極、および細胞分裂などを生じる。本明細書中に記載されるような人為的アプローチを使用することにより、「正常な」インビボT細胞活性化の非存在下において、特にTCRおよびCD28の加速され、制御され、かつ空間的に配向付けられた連結を通して、上記の機能を加速し得るか、上記の機能を改善し得るか、さもなければ上記の機能に影響を及ぼし得る。利点は、治療的適用のための多数の注入可能でありかつより頑強な細胞を生じる、インビトロでの細胞増殖の改善であり得る。他の利点は、細胞表面上における正常未満のTCR密度のような欠損を有する細胞についてのレセプター「凝集」の改善であり得る。同様に、インビボ適用は、特定のT細胞集団（例えば、腫瘍部位での腫瘍特異的T細胞）が活性化される必要のある場合に有益であり得る。レセプターの凝集および配向付けの改善は、さもなければ機能的に寛容化されたT細胞を得ることが困難な活性化シグナルを提供し得る。さらに、このような活性化は、抗原特異的なT細胞の状況下において使用され得る。これに関して、腫瘍由来のT細胞が単離され得、そして増殖され得、そして患者に注入され得る。同様に、インビボまたはインビトロのいずれかで抗原に曝露されたT細胞が、本発明の方法論によって増殖され得る。

【0060】

別の例では、細胞死の誘導の改善が、FAS経路を介して生じる：FASの多量体化を加速する能力、標的細胞表面上において「活性化された」FASを空間的に配向付ける能力

、または、さもなくば達成不可能である累積的なFAS連結を促進する能力は、特に、癌、自己免疫応答、または対宿主性移植片病を処置するために、インビボで顕著な利点を提供し得る。例えば、腫瘍細胞は、インビボで低レベルのFASを発現し得、そして宿主は、腫瘍部位で低レベルのFAS-Lを発現し得る（抑制性サイトカインなどに起因する）。これらの低いレベルに起因して、十分なFASシグナルは生成され得ず、腫瘍の生存および増殖が許容される。このFAS/FASリガンド欠損を克服するために可能な1つの方法は、常磁性粒子に結合したFASに対する一価リガンドまたは多価リガンド（FAS-L、抗体など）を用いて、腫瘍/腫瘍部位を標的化することであり得る。腫瘍部位（例えば、黒色腫、カポジ肉腫、扁平上皮頸部癌（squamous cell neck carcinoma）など）で本発明を使用する強力な磁場の適用は、腫瘍部位で常磁性粒子の空間的配向付けを提供し得る。なぜなら、腫瘍細胞においてFASに結合した粒子は、レセプターの活性化および/またはT細胞の活性化および増殖に適合されるからである。シグナル分極によって達成されるFAS凝集の増加は、ここで、腫瘍細胞において細胞死を誘導するために十分なシグナルを提供し得る。

【0061】

本発明の1つの特定の実施形態では、T細胞集団を、T細胞表面を同時に濃縮しかつ連結することによって刺激し得る。本発明の1つの局面では、CD3およびCD28に対する抗体は、表面上に同時固定される。このような固定化のために好ましい表面としては、粒子が挙げられ、そして特定の局面では、ビーズ（例えば、常磁性ビーズ）が挙げられる。本発明の別の局面では、TCR/CD3複合体を結合し、そして一次刺激シグナルを開始する任意のリガンドが、表面上に固定された一次活性化因子として利用され得る。CD28を結合し、そしてCD28シグナル伝達経路を開始し、それによってCD3リガンドを有する細胞の同時刺激を引き起こし、かつT細胞集団の活性化を増強するリガンドはいずれもCD28リガンドであり、従って、本発明の状況下における同時刺激因子である。本発明のさらなる局面では、T細胞ならびに抗CD3および抗CD28コーティング表面の混合物に力を適用して、T細胞を濃縮し、それによってT細胞の表面連結を最大化する。1つの特定の実施形態では、この濃縮力は、抗CD3および抗CD28コーティング表面が常磁性ビーズである場合に適用される磁気力であるが、細胞とリガンドとを一緒に濃縮様式にするための他の手段が、当該分野で利用可能である。T細胞集団を刺激するこのような方法は、T細胞の驚くほど高い活性化および/または増殖を誘導する、顕著なビーズ-細胞接触および/または細胞-細胞接触を与える。さらに、本発明の方法は、細胞表面マーカープロファイルを変更する。ここでは、活性化T細胞は、より正常な表現型および疾患を有する被験体から最初に単離された場合のT細胞のプロファイルと比較して変動の少ない最終産物を示す、細胞表面マーカーを発現する。

【0062】

（1. 一次シグナル）

エキソビボでのT細胞刺激を担う生化学的事象を、以下に簡潔に示す。抗原提示細胞において、MHCクラスI分子またはMHCクラスII分子のいずれかと共に提示される抗原とTCR/CD3複合体との間の相互作用は、抗原特異的T細胞活性化と称される一連の生化学的事象を開始する。従って、T細胞の活性化は、T細胞TCR/CD3複合体を刺激することによってか、またはCD2表面タンパク質を刺激することによって、達成され得る。抗CD3モノクローナル抗体を使用し、TCR/CD3複合体を介してT細胞集団を活性化し得る。多数の抗ヒトCD3モノクローナル抗体が市販されており、例は、American Type Culture Collectionから入手されるハイブリドーマ細胞から調製されるOKT3、およびモノクローナル抗体G19-4である。同様に、抗CD2抗体の刺激性形態が公知であり、そして入手可能である。抗CD2抗体を用いるCD2を介した刺激は、代表的に、少なくとも2つの異なる抗CD2抗体の組み合わせを使用して達成される。記載されている抗CD2抗体の刺激性の組み合わせとしては、以下が挙げられる：T11.1またはT11.2抗体（Meuerら、Cell 36:897-906、1984）との組み合わせにおけるT11.3抗体、および9-1抗

体 (Yangら、J. Immunol. 137:1097-1100、1986) との組み合わせにおける 9.6 抗体 (これは、T11.1 と同じエピトープを認識する)。上記のいずれかの抗体と同じエピトープに結合する他の抗体もまた使用され得る。さらなる抗体、または抗体の組み合わせが、標準的な技術によって調製され得、そして同定され得る。

【0063】

一次活性化シグナルはまた、他の機構を介して T 細胞に送達され得る。例えば、使用され得る組み合わせとしては、ホルボールエステル (例えば、ホルボールミリスチートアセテート) のようなプロテインキナーゼ C (PKC) アクチベーター、およびカルシウムイオノフォア (例えば、イオノマイシン (これは、細胞質カルシウム濃度を上昇させる) など、が挙げられる。このような因子の使用は、TCR/CD3 複合体を迂回するが、T 細胞に刺激シグナルを送達する。一次シグナルとして作用する他の因子には、天然のリガンドおよび合成リガンドを含まれ得る。天然のリガンドには、MHC (提示されたペプチドを有するかまたは有さない) を含まれ得る。他のリガンドには、ペプチド、ポリペプチド、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、糖ペプチド、可溶性レセプター、ステロイド、ホルモン、マイトジェン (例えば、PHA) または他のスーパー抗原が含まれ得るが、これらに限定されない。本発明の状況下で、濃縮および刺激の使用は、二次シグナルが T 細胞の増殖を誘導するために必要とされないような、高いレセプター偏向 (polarization) を生じ得る。

【0064】

他の実施形態において、任意の種のシグナル伝達事象は、本発明を利用することによって拡大または分析され得る。例えば、G タンパク質結合レセプターは、本発明の濃縮方法を使用して刺激および測定され得る。

【0065】

(2. 二次シグナル)

TCR/CD3 複合体または CD2 分子の刺激は、T 細胞における一次活性化シグナルの送達に必要とされるようであるが、T 細胞の表面上の多くの分子 (補助分子または同時刺激分子といわれる) は、休止 T 細胞から芽球転換への移行、ならびに引き続く増殖および分化の調節に関係している。従って、一次活性化シグナルに加えて、T 細胞応答の誘発は、第 2 の同時刺激シグナルを必要とする。1 つのこのような同時刺激分子または補助分子である CD28 は、TCR 複合体によって刺激されるシグナル伝達経路とは異なるシグナル伝達経路を開始または調節すると考えられる。

【0066】

従って、外因性増殖因子またはアクセサリ細胞の非存在下で T 細胞の集団の活性化および増殖を増強するために、T 細胞の表面上の補助分子 (例えば、CD28) を、その補助分子を結合するリガンドで刺激する。1 つの実施形態では、補助分子 CD28 の刺激および T 細胞の活性化は、T 細胞の集団に、CD3 を結合するリガンドおよび CD28 を結合するリガンドが結合する表面を接触させることにより同時に生じる。T 細胞の活性化 (例えば、抗 CD3 抗体での) および CD28 補助分子の刺激は、CD4⁺ T 細胞の選択的な増殖を生じる。

【0067】

従って、当業者は、任意の因子 (抗 CD28 抗体、または CD28 分子と交差結合し得るそのフラグメント、あるいは CD28 に対する天然リガンドを含む) を使用して、T 細胞を刺激し得ることを認識する。本発明の状況において有用な、例示的な抗 CD28 抗体またはそのフラグメントとしては、モノクローナル抗体 9.3 (IgG2_a) (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ)、モノクローナル抗体 KOLT-2 (IgG1)、15E8 (IgG1)、248.23.2 (IgM) および EX5.3D10 (IgG2_a) (ATCC HB11373) が挙げられる。例示的な天然リガンドとしては、B7 ファミリーのタンパク質 (例えば、B7-1 (CD80) および B7-2 (CD86) (Freemanら、J. Immunol. 137:3260

—3267, 1987; Freemanら、J. Immunol. 143:2714-2722, 1989; Freemanら、J. Exp. Med. 174:625-631, 1991; Freemanら、Science 262:909-911, 1993; Azumaら、Nature 366:76-79, 1993; Freemanら、J. Exp. Med. 178:2185-2192, 1993))が挙げられる。さらに、天然リガンドの結合ホモログもまた、ネイティブであるかまたは化学技術もしくは組換え技術によって合成されたかに関わらず、本発明に従って使用され得る。二次シグナルとして作用する他の因子には、天然のリガンドおよび合成リガンドが含まれ得る。因子としては、他の抗体またはそのフラグメント、ペプチド、ポリペプチド、増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、糖ペプチド、可溶性レセプター、ステロイド、ホルモン、マイトジェン（例えば、PHA）または他のスーパー抗体が挙げられ得るが、これらに限定されない。

10

【0068】

本発明のさらなる実施形態において、T細胞集団の活性化は、他のT細胞膜内在タンパク質の同時刺激によって増強され得る。例えば、T細胞インテグリンLFA-1のその天然のリガンドICAM-1への結合は、細胞の活性化を増強し得る。T細胞についての同時刺激因子として作用し得る別の細胞表面分子は、VCAM-1 (CD106)であり、これは、T細胞上の最晩期抗原-4 (very-late-Antigen-4) (VLA-4)を結合する。

【0069】

当業者は、T細胞以外の細胞が、細胞表面部分を連結しそしてその部分の凝集を誘導する因子の結合によって刺激され得、これが、次いで、シグナル伝達経路の活性化を生じることとを認識する。他のこのような細胞表面部分としては、GPIアンカー型葉酸レセプター (CD59)、ヒトIgEレセプター (FcεR1レセプター)、BCR、EGFレセプター、インスリンレセプター、エフィリン (e ph r i n) B1レセプター、ニューロトロフィン、グリア細胞由来神経栄養 (neutrophic) 因子 (GDNF)、ヘッジホッグおよび他のコレステロール連結タンパク質およびパラミリストイル化タンパク質、H-Ras、インテグリン、内皮一酸化窒素シンターゼ (eNOS)、FAS、TNFレセプターファミリーのメンバー、GPIアンカー型タンパク質、二重アシル化タンパク質（例えば、Srcファミリーキナーゼ）、ヘテロ三量体Gタンパク質のαサブユニット、および細胞骨格タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0070】

(B. T細胞集団の拡大)

本発明の1つの局面において、エキソビボでのT細胞拡大が、T細胞の単離およびその後の刺激によって行われ得る。本発明の1つの実施形態において、T細胞は、単一の因子によって刺激され得る。別の実施形態において、T細胞は、2つの因子によって刺激され、一方は、一次シグナルを誘導し、そして2つ目は、同時刺激シグナルである。単一のシグナルの刺激または一次シグナルの刺激に有用なリガンド、および二次シグナルを刺激する補助分子は、可溶性形態で使用され得るか、細胞の表面に結合され得るか、または本明細書中に記載のように表面に固定化され得る。表面に結合されるリガンドまたは因子は、「代理」抗原提示細胞 (APC) として作用する。好ましい実施形態において、一次因子および二次因子の両方が、表面上に共に固定化される。1つの実施形態において、一次活性化シグナルを提供する分子（例えば、CD3リガンド）および同時刺激分子（例えば、CD28リガンド）が、同じ表面（例えば、粒子）に結合される。さらに、先に記載したように、1個、2個またはそれ以上の刺激分子が、同じ表面上または異なる表面上で使用され得る。

40

【0071】

拡大前に、T細胞の供給源を、被験体から得る。用語「被験体」は、免疫応答が誘発され得る、生きた生物体（例えば、哺乳動物）を含むことが意図される。被験体の例としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が挙げられる。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、脾臓組織および腫瘍を含む、多く

50

の供給源から得られ得る。好ましくは、個体の循環中の血液由来の細胞は、アフエレーシスまたは白血球搬出法によって得られる。アフエレーシス生成物は、代表的に、リンパ球（T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球を含む）、赤血球および血小板を含む。1つの実施形態において、アフエレーシスによって収集された細胞は、血漿画分を除去するため、およびその後の処理工程のための適切な緩衝液または培地中に置くために、洗浄され得る。本発明の1つの実施形態において、細胞を、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で洗浄する。代替的な実施形態において、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、そしてマグネシウムを欠き得るかまたは多くの（全てではなくとも）二価カチオンを欠き得る。再度、驚くことに、カルシウムの非存在下での最初の活性化工程は、活性化の拡大を導く。当業者が容易に認識するように、洗浄工程は、当該分野で公知の方法によって（例えば、半自動化「フローズルー」遠心分離（例えば、Cobe 2991細胞プロセッサー、Baxter）をその製造業者の説明書に従って使用することによって）達成され得る。洗浄後、細胞を、種々の生体適合性の緩衝液（例えば、無Ca、無MgのPBS）中に再懸濁し得る。あるいは、アフエレーシスサンプルの所望でない成分は、除去され得、そして細胞を、培養培地中に直接再懸濁し得る。

10

別の実施形態において、T細胞が、赤血球を溶解しそして例えば、PERCOLLTM勾配を介する遠心分離によって、単球を除去することによって、末梢血白血球が単球から単離される。CD28⁺T細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD45RA⁺T細胞、およびCD45RO⁺T細胞のような、T細胞の特定の部分集団が、ポジティブ選択技術またはネガティブ選択技術によってさらに単離され得る。例えば、ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、ネガティブに選択される細胞に特有の表面マーカーに対する抗体の組合わせを用いて達成され得る。好ましい方法は、ネガティブな磁気免疫接着（magnetic immunoadherence）またはフローサイトメトリーを介する細胞選別および／または細胞選択であり、それはネガティブに選択される細胞上に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体混合物を利用する。例えば、ネガティブ選択によってCD4⁺細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体混合物は、代表的に、CD14に対する抗体、CD20に対する抗体、CD11bに対する抗体、CD16に対する抗体、HLA-DRに対する抗体、およびCD8に対する抗体を含む。

20

【0072】

上記の単球除去に関して、単球集団（すなわち、CD14⁺細胞）が、エキソピボ増殖の前に、種々の方法（抗CD14コードビーズまたは抗CD14コートカラム、または除去を容易にするためのこれらの細胞の食作用活性の利用を含む）によって、血液調製物から除去され得る。従って、1つの実施形態において、本発明は、食細胞単球により飲み込まれるに十分なサイズの常磁性粒子を使用する。特定の実施形態において、この常磁性粒子は、市販のビーズ、例えば、DynabeadTMの商標名の下でDynal ASによって作製されたものである。これに関する例示的DynabeadTMは、M-280、M-450、およびM-500である。1つの局面において、他の非特異的細胞が、「無関係の」タンパク質（例えば、血清タンパク質または抗体）でその常磁性粒子をコーティングすることによって、除去される。無関係のタンパク質および無関係の抗体としては、増殖されるべきT細胞を特異的には標的としない、タンパク質および抗体またはそれらのフラグメントが挙げられる。特定の実施形態において、無関係のビーズとしては、ヒッジ抗マウス抗体でコーティングしたビーズ、ヤギ抗マウス抗体でコーティングしたビーズ、およびヒト血清アルブミンでコーティングした抗体が挙げられる。

30

40

【0073】

簡潔には、このような単球除去は、フィコール処理した全血またはアフエレーシスした末梢血を、1つ以上の種類の無関係な抗体もしくは非抗体に結合した常磁性粒子（1バッチの細胞（代表的には約 5×10^8 細胞～約 2×10^{10} 細胞）に対して約1バイアルのビーズまたは 4×10^9 ビーズ）とともに、22℃～37℃で約30分～2時間プレインキュベートし、その後、その常磁性粒子に結合したかまたは包まれた細胞を磁氣的に除去することによって、実施される。このような分離は、当該分野で利用可能な標準的方法を使

50

用して実施され得る。例えば、市販されている種々のもの（例えば、DYNAL（登録商標）Magnetic Particle Concentrator（DYNAL MPC（登録商標））を含む、任意の磁気分離方法が使用され得る。必要な除去の確かさが、その除去の前および後に、当業者に公知の種々の方法（CD14陽性細胞のフローサイトメトリー分析を含む）によってモニターされ得る。

【0074】

刺激のためにT細胞を調製するための別の方法は、洗浄工程後にその細胞を凍結することであり、これは、単球除去工程を必要としない。理論に拘束されることを望まないが、凍結工程およびその後の融解工程は、その細胞集団の顆粒球を除去しそしてある程度単球を除去することによって、より均一な生成物を提供する。血漿および血小板を除去するこの洗浄工程の後、この細胞は、凍結溶液中に懸濁され得る。多くの凍結溶液およびパラメーターが、当該分野において公知であり、そしてこの状況において有用であるが、1つの方法は、20% DMSOおよび8%ヒト血清アルブミンを含むPBSまたは他の適切な細胞凍結媒体を使用する工程を包含し、その後、その細胞は、1分あたり1℃の速度で-80℃まで凍結され、そして液体窒素貯蔵タンクの気相において貯蔵される。

【0075】

その細胞集団は、本明細書中に記載されるように、例えば、表面上に固定された抗CD3抗体または抗CD2抗体との接触によってか、またはカルシウムイオノフォアと組み合わせたプロテインキナーゼCアクチベーター（例えば、プリオスタチン）との接触によって、刺激され得る。そのT細胞の表面上の補助分子の同時刺激のために、その補助分子を結合するリガンドが使用される。例えば、CD4⁺細胞の集団が、そのT細胞の増殖を刺激するために適切な条件下で、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触され得る。同様に、CD8⁺T細胞の増殖を刺激するために、抗CD3抗体およびモノクローナル抗体ES5.2D8（ATCC）が、当該分野で一般的に公知である他の方法（Bergら、Transplant Proc. 30（8）：3975～3977，1998；Haanenら、J. Exp. Med. 190（9）：1319～1328，1999；Garlandら、J. Immunol. Meth. 227（1～2）：53～63，1999）が使用され得るのと同様に、使用され得る。

【0076】

そのT細胞についての第一刺激シグナルおよび同時刺激シグナルは、種々のプロトコルによって提供され得る。例えば、各シグナルを提供する因子が、溶液中に存在し得るか、または表面に結合され得る。表面に結合された場合、その因子は、同じ表面（すなわち、「シス」構成）にかまたは別々の表面（すなわち、「トランス」構成）に結合され得る。あるいは、1つの因子が表面に結合され得、もう一方の因子が溶液中に存在し得る。1つの実施形態において、同時刺激シグナルを提供する因子が細胞表面に結合され、そして一次活性化シグナルを提供する因子が、溶液中に存在するかまたは表面に結合される。好ましい実施形態において、この2つの因子は、ビーズ上（同じビーズ上（すなわち、「シス」）または別個のビーズ上（すなわち、「トランス」）のいずれか）に固定される。例として、一次活性化シグナルを提供する因子は抗CD3抗体であり、そして同時刺激シグナルを提供する因子は抗CD28抗体であり、そして両方の因子が、等分子量で同じビーズとともに固定されている。1つの実施形態において、CD4⁺T細胞増殖およびT細胞増殖のために、ビーズに結合した1：1の比の各抗体が使用される。しかし、1：500～500：1およびその中間の任意の整数値の粒子：細胞比が、T細胞または他の標的細胞を刺激するために使用され得る。当業者が容易に認識し得るように、粒子：細胞比は、標的細胞に対する粒子サイズに依存し得る。例えば、小さいサイズのビーズは、2～3個の細胞しか結合し得ないが、もっと大きなビーズは、多くの細胞を結合し得る。特定の実施形態において、細胞：粒子比は、100：1～100：1およびその中間の任意の整数値の範囲であり、そしてさらなる実施形態において、その比は、1：9～9：1およびその間の任意の整数値を含み、そしてまた、T細胞を刺激するために使用され得る。T細胞刺激を生じる抗CD3結合ビーズおよび抗CD28結合ビーズ：T細胞の比は、上記のように

変動し得るが、特定の好ましい値としては、少なくとも1:4、1:3、1:2、2:1、3:1、4:1~6:1が挙げられ、1つの好ましい比は、少なくとも2:1のビーズ:T細胞である。

【0077】

特定の方法を使用すると、最初の活性化および刺激の後、そのT細胞を約12~約14日後に刺激から分離することによって、T細胞集団の長期刺激を維持することが有利であり得る。T細胞増殖の速度は、例えば、クールター計数器を用いて、T細胞のサイズを調べることまたはT細胞の体積を測定することによって、周期的に（例えば、毎日）モニターされる。これに関し、休止T細胞は、最初の活性化および刺激の際に、刺激リガンドの存在下で、平均直径約6.8ミクロンを有し、そのT細胞平均直径は、4日目までに12ミクロンを超えるまで増大し、そしておよそ6日目までに減少し始める。この平均T細胞直径が約8ミクロンまで減少した場合、そのT細胞は、そのT細胞のさらなる増殖を誘導するように再活性化および再刺激される。あるいは、T細胞増殖の速度およびT細胞再刺激のための時間は、活性化T細胞上に誘導される細胞表面分子（例えば、B7-1、B7-2）の存在についてアッセイすることによって、モニターされ得る。

【0078】

CD4⁺T細胞および/またはCD8⁺T細胞の集団の長期刺激を誘導するために、そのT細胞を、刺激因子（例えば、抗CD3抗体および抗CD28抗体またはモノクローナル抗体ES5.2D8）で数回再活性化および再刺激して、もとのT細胞集団の約10倍~約1,000倍数が増加したCD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞の集団を生じることが必要であり得る。本発明の方法を使用すると、約100倍~約100,000倍のT細胞数を達成することが可能である。さらに、実施例XIIに記載されるように、本発明の方法によって増殖されたT細胞は、培養上清中に高レベルのサイトカイン（例えば、IL-2、IFN- γ 、IL-4、GM-CSFおよびTNF- α ）を分泌する。例えば、IL-2による刺激と比較して、抗CD3および抗CD28同時刺激の使用により増殖されたCD4⁺T細胞は、高レベルのGM-CSFおよびTNF- α を培養培地中に分泌する。これらのサイトカインは培養上清から精製され得るか、またはこの上清が、培養中の細胞を維持するために直接使用され得る。同様に、本発明の方法によって増殖されたT細胞が、培養上清およびサイトカインとともに、インビボで細胞の増殖を支持するために投与され得る。

【0079】

1つの実施形態において、ビーズ（3×28ビーズ）上で同時固定した抗CD3および抗CD28を用いて、細胞を静止状態（低増殖または増殖なし）に戻すのに十分な時間（初回刺激後、約8~14日）、T細胞刺激を実施する。次いで、刺激シグナルを細胞から除き、そしてこの細胞を洗浄して、患者に注入して戻す。刺激相の最後の時点で細胞を、実施例によって証明されるように、本発明の方法によって、これらの細胞が抗原に应答する能力、およびこれらの細胞が記憶様表現型を示す能力によって実証されるように、「超誘導性（super-inducible）」にする。従って、外因的にまたは注入後インビボで抗原のいずれかによっての再刺激の際、活性化T細胞は、持続性CD154発現、サイトカイン産生増大などのような特有の表現型特性によって特徴付けられた強力な反応を実証する。

【0080】

本発明のさらなる実施形態において、T細胞のような細胞を薬剤コーティングビーズと合わせて、このビーズおよび細胞を引き続いて分離し、次いでこの細胞を培養する。別の実施形態において、培養前に、薬剤コーティングビーズおよび細胞は、分離されないが一緒に培養される。さらなる実施形態において、ビーズおよび細胞は、力の付与によってまず濃縮され、細胞表面部分連結（cell surface moiety ligation）を生じ、それにより細胞刺激を誘導する。

【0081】

例えば、T細胞が標的細胞集団である場合、細胞表面部分は、抗CD3および抗CD28

が付着される常磁性ビーズ（CD3×CD28ビーズ）が、T細胞調製物と接触することを可能にすることによって連結され得る。1つの実施形態において、細胞（例えば、 $10^4 \sim 10^9$ / mL の T 細胞）およびビーズ（例えば、 1.5×10^9 CD3×CD28 常磁性ビーズ）を緩衝液、好ましくは PBS（カルシウムおよびマグネシウムのような二価陽イオンを含まない）中であわせる。ここでも、当業者は、任意の細胞濃度が用いられ得ることを容易に理解し得る。例えば、標的細胞は、このサンプル中で非常にまれであり、そしてわずか 0.01% のサンプルしか標的細胞を含まなくてもよいし、またはサンプル全体（すなわち、100%）が目的の標的細胞を含んでもよい。従って、本発明の文脈には任意の細胞数が含まれる。

【0082】

10

細胞を中に懸濁している緩衝液は、特定の細胞型に適切な任意の緩衝液であり得る。特定の細胞型を利用する場合、緩衝液は、他の成分、例えば 1～5% の血清を含み得、処理の間に細胞の完全性を維持する必要がある。別の実施形態では、この細胞およびビーズは、細胞培養培地中に合わせられ得る。細胞およびビーズは、例えば、回転、攪拌、または混合のための任意の手段で、1分～数時間の範囲の時間で、混合され得る。次いで、ビーズおよび細胞の容器に力（例えば、磁場に配置する）をかけて濃縮する。培地および未結合の細胞を取り出し、そしてビーズに結合した細胞を、例えば、蠕動ポンプによるポンピングによって洗浄し、次いで細胞培養に適切な培地中に再懸濁する。

【0083】

本発明の1つの実施形態において、この混合物を数時間（約3時間）～14日間、またはこの間の任意の整数時間数、培養し得る。本発明の1つの実施形態において、ビーズおよびT細胞を約8日間一緒に培養する。別の実施形態において、ビーズおよびT細胞を2～3日間一緒に培養する。T細胞培養のために適切な条件は、適切な培地（例えば、最小必須培地または RPMI Media 1640 または、X-vivo 15 (Bio Whittaker)）を含む。この培地は、増殖および生存に必須の因子を含み得る。この因子としては、血清（例えば、ウシ胎仔血清またはヒト血清）またはインターロイキン-2 (IL-2) が挙げられる。抗生物質（例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシン）は、被験体に注入されるはずの細胞の培養中ではなく、実験的培養にしか含まれない。標的細胞を、増殖を支持するのに必要な条件（例えば、適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5% CO₂））下で維持する。

20

30

【0084】

濃縮力として磁場を使用する場合、細胞培養の前に細胞に供された電場強度は、磁気表面上で 200 ガウス～12,000 ガウスの範囲内であり得る。磁石の形状およびサイズは、混合もしくは細胞培養容器のサイズおよび形状に、または任意の他のパラメーター（細胞間接触および細胞の濃縮を容易にするかまたは増大する）に適合され得る。磁力は、細胞との混合物内に含まれる、磁石と常磁性ビーズとの間に、緩衝液またはスパーサーとして働く物質を配置することによって拡散され得る。強力な磁力とは、一般に、表面で少なくとも 7500 ガウスであると考えられるが、弱い磁力とは、表面で 2000～2500 の範囲であるとみなされる。常磁性ビーズ上の磁石によって付与されるおよその磁力は、以下の式によって、常磁性ビーズの容積および電場強度に依存する。

40

$$F_{mag} = (v) (\Psi) (B) (dB/dx)$$

ここで、 F_{mag} は、磁力であり、 v は、常磁性ビーズの容積であり、 Ψ は、常磁性ビーズの磁気感受性（製造業者によって与えられる値）であり、 B は磁場強度であり、そして (dB/dx) は、磁場強度勾配である。当業者は、式の右側の因数が得られるかまたは測定できて、付与される磁力を算出することが可能になることを理解する。

【0085】

本発明の方法によって刺激された細胞は、シグナル伝達の誘導、細胞表面マーカーの発現および/または増殖によって示されるように活性化される。T細胞に適切なこのようなマーカーの1つは、CD154である。これは、重要な免疫調節分子であり、CD154の発現は、免疫応答を増幅するのに非常に有利である。CD154は、多くのB細胞、樹状

50

細胞、単球およびいくつかの上皮細胞の上で発現されたCD40分子と相互作用する。従って、CD154発現における、この予期されないそして驚くべき増大は、より有効なT細胞組成をもたらすようである。本明細書に記載されるようなCD3+細胞の刺激は、刺激後1、2、3、または4日後に、特定の細胞表面マーカー（例えば、CD154）発現のレベルの1.1~20倍の増大を示すT細胞を提供する。（実施例5、表2、および図4を参照のこと）。別の細胞表面マーカー（CD25）の発現はまた、培養前の細胞、または他の方法によって刺激された細胞上の発現よりも、濃縮および刺激後のT細胞上で、より大きかった（表2を参照のこと）。

【0086】

当業者は、細胞表面部分連結によって刺激され得る任意の標的細胞が、薬剤コーティング表面（例えば、ビーズ）と合わせられ得ることを理解する。さらに、薬剤コーティング表面（例えば、ビーズ）は、培養前の細胞から、培養中の任意の時点で、または培養の終了時に、分離され得る。さらに、標的細胞に連結された薬剤コーティング表面は、培養の前に非結合細胞から分離され得るか、または他の細胞が、同様に培養中に残り得る。1つの実施形態において、培養前に、薬剤コーティングビーズおよび標的細胞は、分離されないが一緒に培養される。さらなる実施形態において、ビーズおよび標的細胞は、力の適用によって最初に濃縮され、細胞表面部分連結を生じ、これによって刺激および引き続く活性化を誘導する。

【0087】

また、本発明によって、標的細胞（例えば、一次刺激分子および二次刺激分子でコーティングされた表面に結合した、T細胞画分）の濃度を上昇させるための他の手段が意図される。磁力の適用に加えて、重力より大きな他の力（例えば、遠心力、膜透過圧力、および水力であるが、これらに限定されない）が、適用され得る。濃縮はまた、濾過によって達成され得る。

【0088】

当業者は、因子でコーティングされたビーズと刺激されるべき細胞との間の接触が、他の力を使用する濃縮によって増加し得ることを、容易に理解する。従って、濃縮が、重力または拡散を超える様式で細胞と因子とを一緒にする限り、細胞表面部分がリガンドを結合している細胞を濃縮するための任意の手段で十分である。

【0089】

種々の実施形態において、因子でコーティングされた表面が、粒子（例えば、ビーズ）であり、これが細胞と混合され、そして磁場において少量に濃縮され、従って、全ての粒子および粒子に結合した細胞を規定された濃縮領域に引くことが、理解されるべきである。特定の実施形態において、因子でコーティングされた表面は、標的細胞に曝露されている30秒間~4時間以内に、力によって一緒に引かれ得る。他の実施形態において、この時間は、1分間~2時間、またはこの間の全ての整数の範囲であり得る。少なくとも1つの細胞表面リガンドが付着する表面と混合された、レセプター保有細胞を有する細胞集団への、力の適用は、細胞レセプター分極を引き起こし得、細胞表面分子を凝集させる。このことは、細胞表面分極が、脂質ラフト（raft）を含む細胞表面分子を凝集させることによって、細胞内のシグナル伝達を増強し得ることを意味する。このような凝集は、細胞事象のダウンレギュレーションまたは抑制を導き得る、シグナル伝達経路を誘導し得る。あるいは、細胞表面分子の凝集は、細胞事象のアップレギュレーションまたは活性化を導き得る。

【0090】

細胞事象としては、例えば、特定の経路（アポトーシス経路を含む）を誘導または抑制するか、あるいはタンパク質のリン酸化を誘導するか、あるいは増殖シグナルを刺激または抑制する、レセプター媒介シグナル伝達が挙げられ得る。1つの実施形態において、細胞は、リンパ球（特に、T細胞）であり得、そして細胞表面リガンドは、表面（例えば、粒子）に付着した抗CD3抗体であり得る。この粒子は、常磁性ビーズであり得、そして適用される力は、磁力であり得る。リンパ球と、抗CD3で被覆した常磁性ビーズの表面と

の混合物への磁力の適用は、T細胞のCD3レセプターの分極を、外力の非存在下で起こるよりずっと速く引き起こし得る。T細胞を刺激する方法は、T細胞免疫応答経路のより迅速な活性化および細胞の増殖を促進する。

【0091】

別の実施形態において、抗CD3／抗CD28（すなわち、CD3×CD28）で被覆したビーズのような刺激因子への曝露時間は、所望のT細胞表現型を得るために、改変するかまたはあつらえ得る。ヘルパーT細胞（ T_H ）（代表的には、CD8⁺細胞傷害性T細胞またはサプレッサT細胞（ T_c ）と対照的に、CD4⁺）のより大きな集団が所望であり得る。なぜなら、 T_H 細胞の増殖は、全体の免疫応答性を改善または回復し得るからである。多くの特異的免疫応答が、CD8⁺抗原特異的T細胞（これは、標的細胞を直接溶解または殺傷し得る）によって媒介されるが、大部分の免疫応答は、CD4⁺T細胞（これは、例えばGM-CSF、CD40L、およびIL-2のような、重要な免疫調節分子を発現する）の補助を必要とする。CD4媒介性補助が好ましい場合には、CD4：CD8の比を保存または増強する、本明細書中に記載される方法のような方法は、非常に有利であり得る。CD4⁺T細胞の増加した数は、患者に導入される細胞発現されたCD40Lの量を増加させて、標的細胞の可視性を潜在的に改善し得る（改善されたAPC機能）。類似の効果が、GM-CSFまたはIL-2（これらの全てが、CD4⁺T細胞によって優勢に発現される）を発現する注入される細胞の数を増加させることによって、見られ得る。あるいは、CD4による補助がさほど必要ではなく、そして増加した数のCD8⁺T細胞が所望である状況においては、本明細書中に記載のXCELLERATEアプローチがまた、例えば刺激および／または培養の前にCD8⁺細胞を予め選択することによって、利用され得る。このような状況は、増加したレベルのIFNまたは標的細胞の増加した細胞溶解が好ましい場合に、存在し得る。

【0092】

異なるT細胞集団の単離を果たすために、濃縮力への曝露時間は、変化され得るかまたはパルス化され得る。例えば、このような力が磁力である場合には、目的の特定の表現型を得るために、磁石への曝露または磁場の強度が変化し得、そして／あるいは増殖時間が変化され得る。種々の表現型マーカーの発現は、経時的に変化する；従って、T細胞の特定の集団を得るために、特定の時点が選択され得る。従って、刺激される細胞型に依存して、刺激および／または曝露の時間は、4週間以下、2週間以下、10日間以下、または8日間以下であり得る（4週間以下とは、4週間から1日間（24時間）までの全ての時間範囲を含む）。いくつかの実施形態において、刺激および増殖は、6日間以下、4日間以下、2日間以下行われ得、そして他の実施形態においては、24時間以下程度に短時間、そして好ましくは、4～6時間以下で行われ得る（これらの範囲は、この間の任意の整数値を含む）。T細胞の刺激がより短い時間にわたって行われる場合には、T細胞の集団は、その数が劇的には増加しないかもしれず、この集団は、より強くかつより健常に活性化されるT細胞を提供し、これらは、インピボで増殖し続け得、そして天然のエフェクターT細胞プールにより近く類似し得る。T細胞による補助のアベイラビリティは、しばしば、タンパク質抗原に対する抗体応答における制限因子であるので、T細胞のCD4⁺富化集団を選択的に増殖するかまたは被験体に選択的に注入する能力は、非常に有利である。このような富化された集団のさらなる利点は、Bリンパ球によって提示される抗原を認識する活性化ヘルパーT細胞が2つの型の刺激（物理的接触およびサイトカイン産生であり、これらは、B細胞の増殖および分化を生じる）を送達する点で、容易に明らかである。

【0093】

種々の刺激時間に供されたT細胞は、異なる特性を示し得る。例えば、代表的な血液またはアフエーシスされた末梢血液の単核細胞産物は、細胞傷害性T細胞集団またはサプレッサT細胞集団（ T_c 、CD8⁺）より大きなヘルパーT細胞集団（ T_H 、CD4⁺）を有する。CD3レセプターおよびCD28レセプターを刺激することによる、T細胞のエキソピボ増殖は、約8～9日目より前には優勢的に T_H 細胞からなるが約8～9日目より

10

20

30

40

50

後にはT細胞の集団がT_C細胞の次第に大きくなる集団を含む、T細胞の集団を産生する。従って、処置の目的に依存して、優勢的にT_H細胞からなるT細胞集団を被験体に注入することが、有利であり得る。同様に、T_C細胞の抗原特異的サブセットが単離されている場合には、このサブセットをより大きな程度まで増殖することが、有利であり得る。

【0094】

さらに、CD4マーカーおよびCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーは、有意に、しかし、大部分において再現可能に細胞増殖プロセスの過程の間、再現可能に変化する。このように、再現可能性によって、特定の目的のための活性化T細胞産物を作り変える能力が可能になる。

【0095】

1つのこのような例において、時間とともに再現可能に変化する重要な表現型マーカーには、高い親和性のIL-2レセプター(CD25)、CD40リガンド(CD154)、およびCD45RO(TCRと優先的に会合することによって、抗原結合に対するTCRの感度を増加し得る分子)がある。当業者が容易に理解するように、このような分子は、種々の理由のために重要である。例えば、CD25は、迅速なT細胞分裂を可能にするオートクラインループの重要な部分を構成する。CD154は、抗原提示樹状細胞の変異の刺激；抗体産生のためのB細胞活性化；T_H細胞増殖の調節；T_C細胞の分化の増強；T_H細胞と抗原提示細胞との両方のサイトカイン分泌の調節；および同時刺激性リガンド(CD80、CD86およびCD154を含む)の発現の刺激において重要な役割を演じることが示されている。

【0096】

サイトカイン産生は、エキソビボ増殖プロセスの最初の数日においてピークがある。従って、サイトカインがT細胞の活性化および機能ならびに免疫応答調節を媒介するのに重要であることが公知であるので、このようなサイトカインは、多分、治療的T細胞産物(さらなる抗原チャレンジと接触した際に再活性化を受け得る)の発現において重要である。この点において重要なサイトカインとしては、限定しないが、IL-2、IL-4、TNF-αおよびIFN-γが挙げられる。従って、最初の数日の増殖の間、T細胞の集団を得ることおよびこれらの細胞を被験体に注入することによって、さらなる活性化およびT細胞の増殖がインビボで生じる治療的利益が生じ得る。

【0097】

先に議論されるサイトカインおよびマーカーに加えて、T細胞活性化および免疫応答調節の媒介に重要であることが公知の接着分子の発現はまた、エキソビボ発現プロセスの過程にわたって劇的ではあるが再現可能に変化する。例えば、CD62Lは、リンパ球組織に対するT細胞のホーミングおよび炎症部位へT細胞を行き来させる(trafficking)ことに重要である。疾患および損傷についての特定の状況下において、これらの部位における活性化T細胞の存在は、不利であり得る。CD62Lの下方調節が活性化に続いて初期に生じるので、T細胞は、短い期間で増殖され得る。逆に、培養におけるより長い期間は、より高いレベルのCD62Lを有するT細胞集団を生成し、従って、他の好ましい条件下において、これらの部位に活性化されたT細胞を標的化させるより高い能力を生成する。発現が経時にわたって変化するポリペプチドの別の例は、CD49d(炎症の部位の組織空間に血液からリンパ球を行き来させることに関係する接着分子)である。CD49dに対するCD49dリガンドの結合によってまた、T細胞がVCAM-1またはフィブロネクチンリガンドによる結合を介する活性化および増殖のための同時刺激シグナルを受容し得る。接着分子CD54の発現(T細胞-APC相互作用およびT細胞-T細胞相互作用ならびに炎症部位へのホーミングに関与する)はまた、発現の過程にわたって変化する。従って、T細胞は、目的のマーカープロフィールと同時に選択された期間の間、刺激され得、引き続いて、収集され、そして注入される。従って、T細胞集団は、処置される適応症について最大の治療的利益を提供すると考えられるマーカーを発現するように作り変えられ得る。

【0098】

種々の実施形態において、当業者は、細胞から刺激シグナルを除去することは使用される表面の型に依存するということを理解している。例えば、常磁性のビーズが利用される場合、磁気分離が適した選択肢である。分離技術は、常磁性ビーズ製造説明書（例えば、DYNAL Inc. Oslo, Norway）を参照のこと）によって詳細に記載される。さらに、表面が細胞から分離されるのに十分大きいビーズである場合、濾過はまた、用いられ得る。さらに、20ミクロンおよび80ミクロンの注入フィルター（Baxter）を含む、種々の注入フィルターが市販されている。従って、ビーズがフィルターのメッシュサイズより大きい限り、このような濾過は大いに有効である。関連の実施形態において、ビーズは、フィルターを通るが、細胞は残ったままであり、従って、分離を可能にする。

10

【0099】

本明細書中で記載される方法において使用される抗体は、ATCCのような公的供給源から容易に入手され得るが、T細胞補助分子に対する抗体およびCD3複合体は標準的技術によって産生され得る。本発明の方法で使用するための抗体を生産する方法論は当該分野で周知であり、以下にさらに詳細に考察される。

【0100】

（C. 表面上へのリガンドの固定化）

上記のように、本発明の方法は、好ましくは、表面に結合したリガンドを使用する。表面は、そこに結合するかまたはそこに組み込まれるリガンドを有し得、そして生体適合性であり、すなわち、刺激される標的細胞に対して実質的に非毒性である、任意の表面であり得る。生体適合性表面は、生分解性であっても非生分解性であってもよい。表面は、天然であっても合成であってもよく、合成表面はポリマーであり得る。表面は、コラーゲン、精製されたタンパク質、精製されたペプチド、多糖類、グリコサミノグリカン、または細胞外マトリクス組成物を含み得る。多糖類としては、例えば、セルロース、アガロース、デキストラン、キトサン、ヒアルロン酸、またはアルギネートが挙げられ得る。他のポリマーとしては、ポリエステル、ポリエーテル、ポリ無水物、ポリアルキルシアノアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリオルトエステル、ポリホスファゼン、ポリビニルアセテート、ブロックコポリマー、ポリプロピレン、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、またはポリウレタンが挙げられ得る。ポリマーは、乳酸またはコポリマーであり得る。コポリマーは、乳酸およびグリコール酸（PLGA）を含み得る。非生分解性表面としては、ポリ（ジメチルシロキサン）およびポリ（エチレンービニルアセテート）のポリマーが挙げられ得る。生体適合性表面としては、例えば、ガラス（例えば、バイオガラス）、コラーゲン、金属、ヒドロキシアパタイト、アルミネート、バイオセラミック材料、ヒアルロン酸ポリマー、アルギネート、アクリルエステルポリマー、乳酸ポリマー、グリコール酸ポリマー、乳酸／グリコール酸ポリマー、精製タンパク質、精製ペプチド、または細胞外マトリクス組成物が挙げられ得る。表面を含む他のポリマーとしては、ガラス、シリカ、シリコン、ヒドロキシアパタイト、ヒドロゲル、コラーゲン、アクロレイン、ポリアクリルアミド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ナイロン、あるいは多数のプラスチックまたは合成有機ポリマーなどが挙げられ得る。表面は、生物学的構造（例えば、リボソーム）を含み得る。表面は、脂質、プレート、バック、ペレット、繊維、メッシュ、または粒子の形態であり得る。粒子は、コロイド状粒子、ミクロスフェア、ナノ粒子、ビーズなどを含み得る。種々の実施形態において、ビーズまたは他の粒子のような市販の表面（例えば、Miltenyi Particles、Miltenyi Biotec、Germany；Sephacroseビーズ、Pharmacia Fine Chemicals、Sweden；DYNABEADSTM、Dynal Inc.、New York；PURABEADSTM、Prometic Biosciences）が有用である。

20

30

40

【0101】

ビーズが使用される場合、このビーズは標的細胞の刺激を達成する任意のサイズであり得る。ある実施形態において、ビーズは好ましくは約5nm～500μmのサイズである。

50

従って、ビーズサイズを選択はビーズが役立つ特定の使用に依存する。例えば、ビーズが単球欠乏のために使用される場合、単球摂取を容易にするために小さなサイズが選択され（例えば、 $2.8\mu\text{m}$ および $4.5\mu\text{m}$ の直径または吸い込まれ得る任意のサイズ（例えば、ナノメータサイズ））、しかし、濾過によるビーズの分離が所望される場合、 $50\mu\text{m}$ 以上のビーズサイズが、代表的に使用される。さらに、常磁性ビーズを使用する場合、ビーズは代表的に、 $2.8\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ のサイズに及び、より好ましくは $2.8\mu\text{m}$ ～ $50\mu\text{m}$ のサイズに及ぶ。最後に、ビーズは、約 10nm 程度の小ささであり得る、超常磁性ナノ粒子を使用するために選択し得る。従って、上記の議論から、実質的に、任意の粒径が、利用され得ることは、容易に明らかとなる。

【0102】

薬剤は、当該分野で公知であり、そして利用可能な種々の方法によって、表面に付着もしくは結合、または一体化され得る。この薬剤は、天然のリガンド、タンパク質リガンド、または合成リガンドであり得る。この付着は、共有的もしくは非共有的、電気的、または疎水的であり得、そして例えば、化学的、機械的、酵素的手段、もしくは他の手段を含む種々の付着手段によって達成され得、これにより、リガンドは、細胞を刺激し得る。例えば、第1に、リガンドに対する抗体は、表面に付着され得るか、またはアビジンもしくはストレプトアビジンは、ビオチニル化リガンドに結合するために、表面に付着され得る。このリガンドに対する抗体は、抗イディオタイプ抗体を介して表面に付着され得る。別の実施例は、抗体と結合する表面に付着する、タンパク質Aもしくはタンパク質Gまたは他の非特異的抗体結合分子の使用を含む。あるいは、市販の架橋試薬（Pierce、Rockford IL）もしくは他の手段を用いた表面への架橋のような化学的方法によって、リガンドが表面に固定され得る。特定の実施形態において、リガンドは表面に共有結合的に結合している。さらに、1つの実施形態において、製造業者の指示に従って、市販のトシル活性化した（tosyl activated）DYNABEADSTMまたはエポキシ表面反応基を有するDYNABEADSTMが目的のポリペプチドリガンドと共にインキュベートされる。簡潔に言うと、このような条件は、代表的に、 $\text{pH}4\sim\text{pH}9$ 、5のリン酸緩衝液中での、 $4\sim37^\circ\text{C}$ の範囲の温度でのインキュベーションである。

【0103】

1つの局面において、特定のリガンドのような試薬は、単一の起点または複数の起点であり得、そして別の局面において、抗体またはそのフラグメントであり得、T細胞を利用する場合、同時刺激性リガンドは、B7分子（例えば、B7-1、B7-2）である。これらのリガンドは、上記の異なる任意の結合手段によって表面に結合される。この表面に結合したB7分子は、同時刺激分子を発現する細胞から単離されるか、または標準的な組換えDNA技術および発現システムを使用して得られ得、これにより、本明細書中に記載されるような同時刺激分子の生成および単離を可能にする。細胞の表面に結合される場合に、T細胞中の同時刺激シグナルを誘発するための能力を保持するB7分子の、フラグメント、変異体または改変体がまた、使用され得る。さらに、当業者は、T細胞のサブセットの増殖の活性化および誘導に有用な任意のリガンドがまた、ビーズまたは培養容器の表面または任意の表面上で免疫化され得ることを理解する。さらに、リガンドの表面に対する共有結合は、一つの好ましい方法論であるが、第2のモノクローナル抗体による吸着または捕捉がまた、使用され得る。表面に付着する特定のリガンドの量は、この表面がビーズである場合に、フローサイトメトリー（FACS）分析によって容易に決定され得るか、または例えば、この表面が組織培養ディッシュ、メッシュ、ファイバー、バッグである場合に、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）によって決定され得る。

【0104】

特定の実施形態において、刺激性の形態のB7分子もしくは抗CD28抗体またはそれらのフラグメントは、抗CD3抗体のようなTCR/CD3複合体を刺激する薬剤と同じ固相表面に付着される。抗CD3に加えて、抗原シグナルを模倣するレセプターに結合する他の抗体が使用され得る。例えば、ビーズまたは他の表面は、抗CD2抗体とB7分子との組み合わせで、特に抗CD3抗体と抗CD28との組み合わせで、コーティングされ得

る。

【0105】

(D. 試薬)

本発明によって意図される試薬としては、タンパク質リガンド、天然のリガンド、および合成リガンドが挙げられる。細胞表面分子に結合し得る抗原は、特定の条件下で、ライゲーションおよび凝集させシグナル化に導き、これには、レクチン（例えば、PHA、レンチルレクチン、コンカナバリンA）、抗体、抗体フラグメント、ペプチド、ポリペプチド、グリコペプチド、レセプター、B細胞レセプター、およびT細胞レセプターリガンド、細胞外マトリクス成分、ステロイド、ホルモン（例えば、成長ホルモン、コルチコステロイド、プロスタグランジン、テトラヨードチロシン）、細菌部分（例えば、リポポリサッカリド）、マイトジェン、抗原、スーパー抗原およびその誘導体、成長因子、サイトカイン、ウイルスタンパク質（例えば、HIV gp-120）、接着分子（例えば、L-セレクチン、LFA-3、CD54、LFA-1）、ケモカイン、および晶分子が挙げられるが、これらに限定されない。この試薬は、細胞、血液産物、および組織のような天然供給源から単離するか、またはインビトロで増殖した細胞から単離するか、または組換えの、もしくは当業者に公知の他の方法によって調製され得る。

10

【0106】

本発明の一つの局面において、T細胞を刺激することが所望される場合、有用な試薬としては、CD/TCR複合体、CD2、および/またはCD28と結合し得るリガンドが挙げられ、それぞれ、活性化または増殖を開始する。従って、用語リガンドは、細胞表面タンパク質にとって「天然の」リガンド（例えば、CD28にとってのB7分子）であるタンパク質、ならびに細胞表面タンパク質に対する抗体のような人工的なリガンドを含む。このような抗体およびそのフラグメントは、ハイブリドーマ合成、組換えDNA技術およびタンパク質合成のような従来の技術に従って産生され得る。有用な抗体およびフラグメントは、（ヒトを含む）任意の種から誘導され得るか、または1種よりも多くの種に由来する配列を用いるキメラタンパク質として形成され得る。

20

【0107】

当該分野で公知の方法は、抗体、ポリクローナル抗血清、またはリガンドに対して特異的であるモノクローナル抗体を産生するために使用され得る。抗体はまた、所望の特性を有するように設計された、遺伝子操作された免疫グロブリン（Ig）またはIgフラグメントとして産生され得る。例えば、例示によって、抗体としては、第1哺乳動物種由来の少なくとも1つの可変（V）領域および第2の明確な哺乳動物種由来の少なくとも1つの定常領域を有する、キメラ融合タンパク質である、組換えIgGが挙げられるが、これに限定されない。ほとんど一般的に、キメラ抗体は、マウス可変領域配列およびヒト定常領域配列を有する。このようなマウス/ヒトキメラ免疫グロブリンは、相補的決定領域（CDR）を移植することによって「ヒト化」され得、これにより、マウス抗体からヒト誘導化V領域フレームワーク領域およびヒト誘導化定常領域に誘導される、抗原に対して特異的な結合を与える。これらの分子のフラグメントは、タンパク質分解性消化によって、または必要に応じて、ジスルフィド結合およびアルキル化の穏やかな還元後のタンパク質分解性消化によって、または組換え遺伝子操作技術によって産生され得る。

30

40

【0108】

抗体は、約 10^4 M^{-1} 以上、好ましくは約 10^5 M^{-1} 以上、より好ましくは 10^6 M^{-1} 以上、そしてさらに好ましくは約 10^7 M^{-1} 以上の親和性定数 K_d を有するリガンドに特異的に結合する場合に、「免疫特異的」とであると定義される。結合パートナーまたは抗体の親和性は、従来の技術（例えば、Scatchardら（Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660, 1949）により記載される技術、または表面プラズモン共鳴（BIAcore, Biosensor, Piscataway, NJ）により記載される技術）を使用して容易に決定され得る。例えば、Wolffら、Cancer Res., 53:2560-2565, 1993を参照のこと。

【0109】

50

抗体は、一般に、当業者公知の様々な技術のいずれかによって調製され得る（例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratoryを参照のこと）。1つのこのような技術において、動物は、抗原としてのリガンドで免疫されて、ポリクローナル抗血清を生成する。適切な動物としては、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシが挙げられ、そして小哺乳動物種（例えば、マウス、ラットおよびハムスター）が挙げられ得る。

【0110】

免疫原は、リガンドを発現する細胞、精製されたかまたは部分的に精製されたリガンドポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメント、あるいはリガンドペプチドからなり得る。リガンドペプチドは、タンパク質分解切断によって生成されるか、または化学的に合成され得る。免疫のためのペプチドは、宿主動物における抗原応答を生成しそうなアミノ酸配列を決定するために、当業者に公知の方法に従って、リガンドの一次構造、二次構造または三次構造を分析することによって選択され得る（例えば、Novotny, Mol. Immunol. 28:201-207, 1991; Berzoksky, Science 229:932-40, 1985を参照のこと）。

【0111】

免疫源の調製は、リガンドポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメント、あるいはペプチドを、別の免疫原性タンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニンまたはウシ血清アルブミン）に共有結合する工程を包含し得る。さらに、このペプチド、ポリペプチドまたは細胞は、アジュバンド中に乳化され得る（Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, 1988 Cold Spring Harbor Laboratoryを参照のこと）。一般的に、最初の注射の後、動物は、その動物種に好ましいスケジュールに従って、1回以上のブースター免疫を受ける。この免疫応答は、この動物を定期的に出血させ、血清を分離し、そしてこの血清をイムノアッセイ（例えば、オークターロニーアッセイ）で分析して、比抗体価を評価することによってモニタリングされ得る。一旦、抗体価が確立されると、この動物はポリクローナル抗血清を蓄積するために周期的に出血され得る。リガンドポリペプチドまたはペプチドに特異的に結合するポリクローナル抗体は、例えば、タンパク質Aを使用するか、または適切な固体支持体に結合したリガンドポリペプチドまたはペプチドを使用するアフィニティクロマトグラフィーによって、このような抗血清から精製され得る。

【0112】

リガンドポリペプチドまたはそれらのフラグメントもしくは改変体に特異的に結合するモノクローナル抗体は、例えば、KohlerおよびMilsteinの技術（Nature, 256:495-497, 1975; Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976）、およびその改良型を使用して、調製され得る。リガンドポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントに対する所望の特異性を有する抗体を産生する、不死化真核生物細胞株であるハイブリドーマが生成され得る。動物（例えば、ラット、ハムスター、または好ましくは、マウス）は、上記のように調製されたリガンド免疫源で免疫される。免疫した動物から得られるリンパ球細胞、最も一般的には、脾臓細胞は、薬物感受性骨髓腫細胞融合パートナーとの融合によって、好ましくは免疫した動物と同系のパートナーとの融合によって不死化され得る。脾臓細胞および骨髓腫細胞は、数分間、膜融合促進剤（例えば、ポリエチレングリコールまたは非イオン性界面活性剤）と合わせられ、次いで、骨髓腫細胞ではなく、ハイブリドーマ細胞の増殖を支持する選択培地上に、低密度でプレートされる。好ましい選択培地は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）である。十分な時間（通常は、約1~2週間）の後、細胞のコロニーを観察する。単一のコロニーを単離し、そしてこの細胞により産生される抗体を、リガンドポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントに対する結合活性について試験し得る。このリガンド抗原に対して高い親和性および特異性を有する抗体を産生するハイブリドーマが好ましい。リガンドポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントに特異的

に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、本発明によって企図される。

【0113】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培地の上清から単離され得る。マウスモノクローナル抗体の産生のための代替の方法は、ハイブリドーマ細胞を同系マウスの腹腔に注射することである。このマウスは、モノクローナル抗体を含有する腹水を産生する。不純物を従来の技術（例えば、クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈殿または抽出）によって、この抗体から除去し得る。

【0114】

ヒトモノクローナル抗体は、多数の技術によって生成され得る。方法には、ヒト血液細胞のエプスタインバーウイルス（EBV）形質転換（例えば、米国特許第4,464,456号）、ヒトB細胞のインビトロ免疫（例えば、Boernerら、J. Immunol. 147:86-95, 1991）、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有する免役したトランスジェニックマウス由来の脾臓細胞の融合、および酵母人工染色体（YAC）により挿入された免疫グロブリン遺伝子を保有する免役したトランスジェニックマウス由来の脾臓細胞の融合（例えば、米国特許第5,877,397号；Bruggemannら、Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58, 1997；Jakobovitsら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:525-35, 1995を参照のこと）、またはヒト免疫グロブリンV領域ファージライブラリからの単離が挙げられるが、これらに限定されない。

【0115】

本発明で使用するためのキメラ抗体およびヒト化抗体が生成され得る。キメラ抗体は、第1の哺乳動物種由来の少なくとも1つの不変領域ドメインおよび第2の異なる哺乳動物種由来の少なくとも1つの可変領域ドメインを有する（例えば、Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-55, 1984を参照のこと）。最も一般的には、キメラ抗体は、非ヒトモノクローナル抗体由来の少なくとも1つの可変領域ドメイン（例えば、マウス、ラット、またはハムスターモノクローナル抗体由来の可変領域）をコードするポリヌクレオチド配列を、少なくとも1つのヒト不変領域をコードする配列を含むベクターにクローン化することによって構築され得る（例えば、Shinら、Methods Enzymol. 178:459-76, 1989；Wallisら、Nucleic Acids Res. 21:2921-29, 1993を参照のこと）。選択されたヒト不変領域は、特定の抗体に所望されるエフェクター機能に依存し得る。キメラ抗体を生成するための当該分野で公知の別の方法は、相同組換えである（米国特許第5,482,856号）。好ましくは、ベクターは、キメラ抗体の安定な発現のために、真核生物細胞にトランスフェクトされる。

【0116】

非ヒト／ヒトキメラ抗体は、さらに遺伝子操作されて、「ヒト化」抗体を生成し得る。このような抗体は、非ヒト哺乳動物種の免疫グロブリン由来の複数のCDR、少なくとも1つの可変フレームワーク領域、および少なくとも1つのヒト免疫グロブリン定常領域を有する。ヒト化が、非ヒトモノクローナル抗体またはキメラ抗体と比較した場合、減少した結合親和性を有する抗体を生じ得る。従って、当業者は、ヒト化抗体を設計するために1つ以上のストラテジーを使用する。

【0117】

特定の実施形態において、抗体の抗原結合フラグメントの使用が好ましくあり得る。このようなフラグメントは、FabフラグメントまたはF(ab')₂フラグメントを含み、これらは、それぞれ、パパインまたはペプシンでのタンパク質分解性消化によって調製され得る。この抗原結合フラグメントは、例えば、固定化されたプロテインAまたは固定化されたリガンドペプチド、あるいはその改変体またはフラグメントを使用して、アフィニティクロマトグラフィーによって、Fcフラグメントから分離され得る。Fabフラグメントを生成するための代替の方法は、F(ab')₂フラグメントの穏やかな還元、続

くアルキル化を含む。(例えば、Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Bostonを参照のこと)。

【0118】

上記のIg分子のいずれかの非ヒト、ヒト、またはヒト化重鎖および軽鎖可変領域は、単鎖Fv(sFv)フラグメント(単鎖抗体)として構築され得る。例えば、Birdら, Science 242:423-426, 1988; Hustonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988を参照のこと。多機能性融合タンパク質が、sFvをコードするヌクレオチド配列を、インフレームで、種々のエフェクタータンパク質をコードするポリヌクレオチド配列に連結することによって生成され得る。これらの方法は、当該分野で公知であり、そして例えば、EP-B1-0318554、米国特許第5,132,405号、米国特許第5,091,513号、および米国特許第5,476,786号に開示される。

【0119】

リガンドポリペプチドあるいはその改変体またはフラグメントに特異的に結合する抗体を選択するためのさらなる方法は、ファージディスプレイによる(例えば、Winterら, Annu. Rev. Immunol. 12:433-55, 1994; Burtonら, Adv. Immunol. 57:191-280, 1994を参照のこと)。ヒトまたはマウス免疫グロブリン可変領域遺伝子コンビナトリアルライブラリーは、リガンドタンパク質あるいはその改変体またはフラグメントに特異的に結合するIgフラグメント(Fab、Fv、sFvまたはそのマルチマー)を選択するためにスクリーニングされ得るファージベクターにおいて作製され得る(例えば、米国特許第5,223,409号; Huseら, Science 246:1275-81, 1989; Kangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363-66, 1991; Hoogenboomら, J. Molec. Biol. 227:381-388, 1992; Schlebuschら, Hybridoma 16:47-52, 1997、ならびにそこに引用される参考文献を参照のこと)。

【0120】

(細胞集団)

上に議論されたように、本発明は、結合に所望される細胞表面部分を有する任意の細胞型への広い適用可能性を有する。この点に関して、多くの細胞シグナル伝達事象が本発明の方法によって増強され得る。このような方法論は、エキソピボ設定において、治療的に使用されて、患者への注入のために細胞を活性化および刺激し得るか、またはインピボで使用して、標的細胞集団に対する細胞シグナル伝達事象を誘導し得る。しかし、また上記のように、本明細書中に提供される典型的な実施例は、T細胞に関するが、それに限定されない。

【0121】

T細胞に関して、本明細書中に記載される種々の拡張した方法論から生じるT細胞集団は、使用される条件に依存して、種々の特定の表現型特性を有し得る。このような表現型特性は、CD25、CD154、IFN-およびGM-CSFの増加した発現、ならびにCD137、CD134、CD62L、およびCD49dの変更された発現を含む。これらの部分の発現を示差的に制御する能力は、非常に重要であり得る。例えば、抗原提示細胞(例えば、樹状細胞、単球、および白血病性B細胞またはリンパ腫でさえ)上で発現されるCD40分子との接触を介して、より高いレベルの、「調節されたT細胞(tailored T-cell)」でのCD154の表面発現は、抗原提示および免疫応答を増強する。このような戦略は、現在、抗体または組換えCD40Lを介してCD40を結合するために、種々の企業によって使用されている。本明細書中に記載されるアプローチは、この同じシグナルが、より生理学的な様式で、例えば、T細胞によって、送達されることを可能にする。T細胞活性化(XCELLERATE)プロセスを調節することによるIFN分泌を増加させる能力は、抗腫瘍および抗ウイルス応答に重要な、TH1型

免疫応答の生成を促進することを助け得る。CD154と同様に、GM-CSFの増加した発現は、特に、より機能的なコンピテントAPC（樹状細胞）へのAPC前駆体の成熟を促進することに対する効果を介して、APC機能を増強するように機能し得る。CD137およびCD134の発現を変更することは、アポトーシスシグナルに耐性であるか、またはアポトーシスシグナルに感受性であるT細胞の能力をもたらし得る。接着／ホーミングレセプター（例えば、CD62Lおよび／またはCD49d）の発現を制御することは、リンパ系器官、感染部位、または腫瘍部位に向かう注入されたT細胞の能力を決定し得る。

【0122】

本発明のさらなる局面は、増殖の前に、 $CD8^{+}$ または $CD4^{+}$ が枯渇したT細胞集団または組成物を提供する。1つの実施形態において、 $CD8^{+}$ 細胞は、 $CD8^{+}$ マーカーに指向する抗体によって枯渇される。当業者は、 $CD8^{+}$ または $CD4^{+}$ のサンプルの枯渇あるいは逆に $CD4^{+}$ または $CD8^{+}$ 細胞含量を増加させるための、種々の特定の方法論を容易に同定し得る。 $CD4^{+}$ 細胞の増加に関して、本発明の1つの局面は、T細胞集団の刺激の際に、極端に健全なCD154発現プロファイルの同定に焦点が当てられ、ここで、 T_c ($CD8^{+}$) が枯渇されている。上に示したように、CD154は、重要な免疫調節分子であり、その発現は、免疫応答を増幅する際に、極端に有益である。従って、CD154発現の増加は、より有効なT細胞組成物を導くようである。

【0123】

本発明のT細胞集団の表現型特性は、当業者に公知である標準的なフローサイトメトリー法およびELISA法を含む、種々の方法によってモニタリングされ得る。

【0124】

当業者は、本明細書中に記載される細胞刺激方法論が、種々の環境（すなわち、容器）で、実施され得ることを容易に理解する。例えば、このような容器は、特に、滅菌環境中の、培養フラスコ、培養バックまたは細胞を保持し得る任意の容器であり得る。本発明の1つの実施形態において、バイオリアクターがまた、有用である。例えば、いくつかの製造業者が、現在、細胞を増殖するために使用され得、そして本発明の方法と組合せて使用され得るデバイスを作製する。例えば、Celdyne Corp., Houston, TX; Unisyn Technologies, Hopkinton, MA; Synthecon, Inc. Houston, TX; Aastrom Biosciences, Inc. Ann Arbor, MI; Wave Biotech LLC, Bedminster, NJを参照のこと。さらに、このようなバイオリアクターをカバーする特許としては、米国特許第6,096,532号；同第5,985,653号；同第5,888,807号；同第5,190,878号（これらは、本明細書中で参考として援用される）が挙げられる。

【0125】

（使用方法）

上記の方法に加えて、本明細書中に記載される方法によって刺激および／または活性化される細胞は、種々の状況において利用され得る。T細胞の模範的な例に関して、本明細書中に記載される方法論は、感染性の疾患、癌の処置、および免疫療法での使用のための $CD28^{+}$ 、 $CD4^{+}$ 、 $CD8^{+}$ 、 $CD45RA^{+}$ 、または $CD45RO^{+}$ T細胞集団の選択的な増殖のために使用され得る。結果として、表現型的に独特なT細胞集団（これは、抗原反応性についてはポリクローナルであるが、 $CD4^{+}$ または $CD8^{+}$ のいずれかに関しては本質的に同質である）が産生され得る。さらに、この方法は、個体の総 $CD4^{+}$ または $CD8^{+}$ T細胞集団の再構成に十分な数で、T細胞集団の増殖を可能にする（個体におけるリンパ球集団は、約 10^{11} である）。得られるT細胞集団はまた、遺伝的に形質導入され得、そして免疫療法のために使用されるか、または感染因子のインビトロ分析方法において使用され得る。例えば、腫瘍浸潤リンパ球の集団は、癌に罹患した個体および十分な数まで増殖するために刺激されたT細胞から得られ得る。得られるT細胞集団は、腫瘍壊死因子（TNF）または他のタンパク質を発現するために遺伝的に形質導入され得

、そして個体に与えられる。

【0126】

本発明のCD4⁺T細胞集団についての1つの特定の使用は、個体におけるHIV感染の処置である。HIVでの長期の感染は、最終的にCD4⁺Tリンパ球の数における顕著な減少を生じる。次に、この減少は、顕著な免疫欠損状態を引き起こし、生命を脅かす多くの日和見感染症に対して患者を感受性にする。正常なレベルへのCD4⁺T細胞の数の補充は、有意な程度まで免疫機能を回復することが予期され得る。したがって、本明細書中に記載される方法は、HIVに感染した患者において、この集団を再構成するために十分な数までCD4⁺T細胞を選択的に増殖するための手段を提供する。長期の刺激の間のT細胞の感染を回避することもまた必要であり得るか、またはHIV感染に対してT細胞を持続的に耐性にすることが望ましくあり得る。感染した個体にT細胞を回復する前に、T細胞をHIV感染に対して耐性にするか、またはウイルスを産生できないようにするかのいずれかを行い得る多くの技術が存在する。例えば、1つ以上の抗レトロウイルス剤は、HIVの複製またはウイルスの産生を阻害するために、増殖の前にCD4⁺T細胞と共に培養され得る（例えば、ウイルスの仕組み（machinery）の逆トランスクリプターゼおよび／または他の成分を標的化する薬物。例えば、Chowら、Nature 361:650-653, 1993を参照のこと）。

10

【0127】

いくつかの方法が、HIVの感染または複製を阻害する分子を生成するためにT細胞を遺伝的に形質導入するために使用され得る。例えば、種々の実施形態において、T細胞は、トランス優性（transdominant）インヒビター、「囃分子（molecular decoy）」、アンチセンス分子、または毒素を産生するために、遺伝的に形質導入され得る。このような方法論は、米国特許出願第08/253,751号、同第08/253,964号、およびPCT公開番号WO 95/33823（これらは、その全体において本明細書中に参考として援用される）においてさらに詳細に記載される。

20

【0128】

抗原特異的T細胞の集団を刺激および増殖するための方法は、被験体へのT細胞の投与の際に免疫応答を上方制御すること（例えば、応答の誘導または既存の応答の増大）が所望される治療的状況において有用である。例えば、この方法は、腫瘍関連抗原に対するT細胞応答を増大するために使用され得る。被験体由来の腫瘍細胞は、代表的に腫瘍関連抗原を発現するが、T細胞における同時刺激シグナルを刺激できないかもしれない（例えば、これらが同時刺激分子の発現を欠くため）。したがって、腫瘍細胞は、被験体由来のT細胞とインビトロで接触され得、そして抗原特異的T細胞が本発明の方法に従って増殖され、そしてT細胞が被験体に戻される。

30

【0129】

従って、1つの実施形態において、非ホジキンリンパ腫（NHL）およびB細胞慢性リンパ球白血病（B-CLL）のような悪性疾患が処置され得る。増殖したT細胞を使用する初期の研究が、NHLにおいて試験されてきたが（Liebowitzら、Curr. Opin. Onc. 10:533-541, 1998を参照のこと）、本発明のT細胞集団は、増加した移植（おそらく、CD28シグナルの刺激によって供給される）および反応性を提供することによって、免疫療法の成功を劇的に増大し得る独特の表現型特徴を提供する。しかし、B-CLLを有する患者は、特別な困難（全身的なT細胞免疫抑制を伴う末梢血における高い白血病細胞負荷での、比較的少ないT細胞数を含む）を示す。本発明のT細胞集団は、この疾患の処置において、特に幹細胞（CD34⁺）移植治療と組合せられる場合に、劇的に改善された効力を提供し得る。従って、抗CD3×抗CD28同時固定ビーズを用いる、増加するT細胞機能および抗CLL T細胞活性は、有利である。

40

【0130】

例えば、B-CLL患者のT細胞でのCD154（CD40についてのリガンド）の不完全な発現が、疾患の主要な免疫学的欠損として言及されると仮定すると、本発明のT細胞集団（これは、再注入の際に、維持された高レベルのCD154発現を提供し得る）は、

50

その処置において補助し得る。研究者らは、CLLにおいて、白血病B細胞がCD80およびCD86を発現する能力と同様に、患者のT細胞がCD154を発現する能力が不完全であることを報告する。CLLにおける白血病B細胞によるCD28についてのリガンドの適切な発現の失敗は、腫瘍応答性T細胞の完全な活性化の失敗を生じ得、従って、T細胞の見かけ上の寛容状態の根底にある機構を示し得る。溶解性抗CD40抗体を介してかまたはCD154で形質導入された白血病B細胞を介してかのいずれかで、CD40がCLL B細胞に係合される研究は、CD80およびCD86の発現における欠損を補正し、そしてMHC表面発現を上方制御するようである。Katoら, J. Clin. Invest. 101:1133-1141, 1998; RanheimおよびKipps, J. Exp. Med. 177:925-935, 1993。このようにして処置される細胞は、特異的なT細胞の抗腫瘍応答を刺激することが可能であった。

10

【0131】

本発明のT細胞集団の表面上のCD154の増強された発現に関して、このようなT細胞は、自己B-CLL細胞と相互作用することが予想され、従って、MHC、CD80、およびCD86の発現を駆動することによって腫瘍の免疫原性を増加する。これは次に、強力な抗腫瘍応答を導くはずである。さらに、当業者は、本発明のエキソビボ拡大されたT細胞を用いた患者の処置が従来の癌治療（例えば、化学療法）と組み合わせられ得ることを容易に理解する。この点に関して、例えば、患者は、フルダラビンまたはカンパス（campath）のような薬剤を用いて処置され、続いて、本発明のT細胞集団または両方で注入され得る。

20

【0132】

あるいは、T細胞は、本明細書中に記載されるように刺激され拡大されて、病原性因子（例えば、ウイルス（例えば、ヒト免疫不全ウイルス）、細菌、寄生虫および真菌）に対する応答性を誘導または増強し得る。

【0133】

本発明はさらに、T細胞の混合集団からT細胞の特定の亜集団を選択的に拡大するための方法を提供する。詳細には、本発明は、かなり高い割合のCD4⁺およびCD8⁺二重ポジティブT細胞を有する特異的に富化されたT細胞集団を提供する。

【0134】

本発明の別の実施形態は、CD4⁺T細胞集団からT_{H1}細胞集団を選択的に拡大するための方法を提供する。この方法において、CD4⁺T細胞は、抗CD28抗体（例えば、モノクローナル抗体9.3）を用いて同時刺激され、T_{H1}特異的サイトカイン（IFN-γを含む）の分泌を誘導し、T_{H2}細胞を超えたT_{H1}細胞の富化をもたらす。

30

【0135】

活性化T細胞の表現性特性が拡大プロセスの間の長い間に変化するという本明細書中における観察は、T細胞が数時間内に活性化されることが実証された事実と合わせられた（Iezzira, Immunity 8:89-95, 1998）。従って、本明細書中に記載される方法論と組合わせて、これは、短い期間にあつらえのT細胞集団のサブセットを拡大する能力を提供する。1つの実施形態において、この技術は、腎臓透析の使用に類似して、被験体のベッドの側で、外来患者の様式で、または被験体の自宅において利用され得る。例えば、T細胞が活性化シグナル（例えば、抗CD3抗体および抗CD28抗体など）と接触してインキュベートされ、そして連続した流れにおいて即座に患者に戻されるか、または数時間の拡大期間の後に患者に戻される、方法およびデバイス。1つの局面において、このような拡大技術は、フィルター成分を有する孤立したチャンバを使用し得、その結果、3×28のビーズまたは同様にコーティングされた微粒子が、血液/濃縮細胞の連続した流れと混合される。別の実施形態において、装置内の固体表面は、抗体または他の成分と直接的（共有結合的を含む）または間接的（例えば、ストレプトアビジン/ビオチンなど）にコーティングまたは刺激されて、T細胞の活性化および拡大を刺激し得る。例えば、血液/細胞の収集デバイスおよび/または使い捨てデバイス（これは、被験体に細胞を戻す前のT細胞活性化に必要とされるレセプターを刺激するための2つ以上の固

40

50

定された抗体（例えば、抗CD3抗体および抗CD28抗体）または他の成分を含む）を介した患者からの連続した流体経路が、使用され得る（プラスチック表面上に固定されるかまたは分離可能な微粒子に固定される）。このようなシステムは、既存の製造業者らの使い捨てのセットと合体されたかまたはまたは製造業者らの使い捨てセットに対して適応させた、滅菌の使い捨てセットを備える白血球除去血輸血装置を含み得る（例えば、抗体／活性化成分が固定／含有される表面プラットフォームは、アフレーシスの間の末梢血単核球の収集のためのバッグ／容器内にある）。さらに、固体表面／表面プラットフォームは、デバイスチャンバのうちの1つに挿入される取り外し可能な挿入物の一部であり得るか、または使い捨て成分の1つの内に物理的に存在する。上記の連続的な流れの局面の別の実施形態において、このシステムは、患者への流路と連続して据え付けられた血液収集デバイス内のチャンバまたはインキュベーションチャンバを用いて、室温または生理学的温度において、細胞を活性化成分と接触させることを含み得る。

10

【0136】

別の例において、血液は、患者から直接的に独立型の使い捨てデバイスに引かれ、このデバイスは、細胞を被験体へ投与する前にT細胞活性化に必要とされるレセプターを刺激するための2つ以上の固定された抗体（例えば、抗CD3抗体および抗CD28抗体）または他の成分（例えば、プラスチック表面上に固定されるかまたは分離可能な微粒子に固定される）を含む。1つの実施形態において、使い捨てのデバイスは、シリンジおよび滅菌合体デバイスとの結合／合体に適した適切な管の接続を有する容器（例えば、プラスチックバッグ、またはフラスコ）を含み得る。このデバイスは、T細胞活性化成分（例えば、抗CD3抗体および抗CD28抗体）の固定のための固体表面を含み；これらは、容器自体の表面であり得るかまたは挿入物であり得、そして代表的には平らな表面、エッチングされた平らな表面、不規則な表面、多孔性パッド、繊維、パッド、繊維、臨床的に受容可能／安全な鉄流体（ferrofluid）、ビーズなどである。さらに、独立型のデバイスを使用する場合、被験体は、デバイスに接続されたままであり得るか、またはこのデバイスは、患者から離され得る。さらに、このデバイスは、室温で利用され得るか、または移動式インキュベーターを用いて生理学的温度でインキュベートされ得る。

20

【0137】

血液および血液産物を収集および処理するためのデバイスおよび方法は周知なので、当業者は、本明細書中に提供される教示を考慮すれば、上記の必要性を満たす種々のデバイスが容易に設計され得るかまたは既存のデバイスを改変し得ることを容易に認識する。従って、このようなデバイスおよび方法は本明細書中に示される特定の実施形態によって限定されないもので、無菌性を維持し得、そして補体の活性化が減少される流体形態の血液を維持する任意のデバイスまたは方法論を含み得、そしてここで、T細胞活性化に必要な成分（例えば、抗CD3抗体および抗CD28抗体またはこれらに対するリガンド）は、被験体への投与前に固定されるか、または血液もしくは血液産物から分離され得る。さらに、当業者が容易に理解し得るように、種々の血液産物が、本明細書中に記載のデバイスおよび方法と組合わせて利用され得る。例えば、この方法およびデバイスは、融解の際および被験体投与の前の、低温保存された全血、末梢血単核急、他の低温保存された血液由来細胞、または低温保存されたT細胞株の由来のT細胞の迅速な活性化を提供する。別の例において、この方法およびデバイスは、被験体への投与前に、事前にエキソビボ拡大されたT細胞産物の活性をブーストするために使用され得、このようにして、高く活性化されたT細胞産物を提供する。最後に、容易に理解されるように、上記の方法およびデバイスは、被験体およびドナーの同時の自家細胞治療または同種細胞治療のために利用され得る。

30

40

【0138】

本発明の方法はまた、ワクチンと合わせて利用され得て、抗原の反応性を増大し、そしてインビボでの効果を増大する。さらに本発明により増大したT細胞が、体内において、相対的に長い半減期を有する場合、これらの細胞は、目的の所望される核酸配列を送達し、そして癌、疾患、または感染部位に潜在的に帰巢することによって、遺伝子治療のための完璧なビヒクルとして機能し得る。したがって、本発明によって増大される細胞は、ワク

50

チン、1つ以上のサイトカイン、1つ以上の治療抗体などとの組み合わせにおいて患者に送達され得る。実質的に、より強力なT細胞集団によって得られる任意の治療は、本明細書に記載される使用方法の文脈に含まれる。

【0139】

(薬学的組成物)

標的細胞集団(例えば、本発明のT細胞集団)は、単独でかあるいは、希釈剤および/または他の成分(例えば、IL-2または他のサイトカイン)または細胞集団との組み合わせの薬学的組成物のいずれかで投与され得る。手短に言えば、本発明の薬学的組成物は、1つ以上の薬学的または生理学的に受容可能なキャリア、希釈剤もしくは賦形剤と組み合わせ、本明細書中で記載する標的細胞集団を含み得る。そのような組成物は、緩衝剤(例えば、中性の緩衝化生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水など);糖質(例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール);タンパク質;ポリペプチドまたはアミノ酸(例えば、グリシン);抗酸化剤;キレート剤(例えば、EDTAまたはグルタチオン);アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム);および防腐剤を含み得る。本発明の組成物は、好ましくは静脈内投与のために処方される。

【0140】

本発明の薬学的組成物は、処置される(または予防される)べき疾患に適切な様式で投与され得る。適切な投与量は、臨床試験によって決定され得るとは言え、投与の量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患の型および重篤度などの因子によって決定される。

【0141】

本明細書中で言及される参考文献はすべて、その全体が本明細書により参考として援用される。さらに、本明細書において利用される全ての数値域は、その特定の数値域の範囲および選択において、全ての整数値を明白に含み、特定の使用に依存して、その範囲が考慮される。さらに、以下の実施例が例示として提供され、これらは限定として提供されるのではない。

【0142】

(実施例)

(実施例1)

(T細胞の刺激)

本明細書に記載される特定の試験において、XCELLERATETMとよぶプロセスを利用した。簡単に言えば、この方法は、XCELLERATED T細胞を末梢血単核球細胞(PBMC)アフエーシス産物から製造した。医療現場において患者から収集した後、PBMCアフエーシスを洗浄し、次いで「コートされていない」DYNABEADS(登録商標)M-450 Epoxy Tとともに、インキュベートした。この間に、単球のような食細胞はビーズを貪食する。インキュベーションの後、細胞およびビーズを、Max Sep Magnetic Separator上で処理して、ビーズおよびビーズに結合していたいずれの単球/食細胞も除く。この単球除去の工程に続いて、全体で 5×10^8 のCD3⁺T細胞を含む容積を取り、そして 1.5×10^9 DYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28 Tを用いて調製して、XCELLERATETMのプロセス(ビーズとT細胞の比が約3:1)を開始する。次いで細胞とDYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28 Tの混合物を37℃、5%二酸化炭素の下で約8日間インキュベートし、第1の注入のためのXCELLERATED T細胞を生産する。単球除去されたPBMCの残りを、第2またはさらなる細胞生産の増大(約21日後)まで凍結保存し、この時にそれらを、解凍し、洗浄し、次いで全体で 5×10^8 のCD3⁺T細胞を含む容積を取り、そして 1.5×10^9 DYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28 Tと調製して、第2の注入のためのXCELLERATEプロセスを開始する。37℃、5%二酸化炭素の下での約8日間インキュベーション期間の間に、CD3⁺T細胞が活性化され、増大する。抗CD3 mAb(OKT3)は、Ortho Biotech. (Raritan, NJ)から得られ、そし

て抗CD28mAb(9.3)は、Bristol-Myers Squibb (Stamford, Conn) から得られる。

【0143】

XCELLERATE IITM とよばれる改変プロセスを用いて、上に記載されるプロセスは、いくつかの改変とともに利用され、ここで、別個の単球を除去する工程は利用されず、特定のプロセスにおいて、細胞を、ビーズとの最初の接触前に、凍結した後、そしてさらに、濃縮および刺激を実施した(図5Aおよび図5Bを参照)。このプロセスの1つのバージョンにおいて、T細胞をアフエーシスによって、ドナーまたは患者の循環血から得られた。アフエーシス産物の成分は、典型的には、リンパ球、単球、顆粒球、B細胞、他の有核細胞(白血球)、赤血球、および血小板を含む。典型的なアフエーシス産物は、 $1 \sim 2 \times 10^{10}$ 有核細胞を含む。これらの細胞をカルシウム不含、マグネシウム不含のリン酸緩衝化生理食塩水を用いて洗浄して、血漿タンパク質および血小板を除く。洗浄工程は、細胞を遠心分離し、上清液を除き、次いでPBSに置換することによって実施した。このプロセスを、半自動化「貫流」遠心分離(COBE 2991 System, Baxter)を用いて達した。細胞は、それら进行处理するような閉鎖系内に維持する。

【0144】

非結合細胞(単球(活性化細胞に富んでいる)を含む)を減少させ、次いで刺激を継続することによって、細胞を、さらに処理し得る。あるいは、洗浄細胞を、凍結し、保存し、後に処置し得るが、増殖の強さを増加することおよび顆粒球を減少することが、本明細書において実証される。1つの例は、細胞を凍結するため、細胞の35ml懸濁液を250mlのCryocyte凍結バッグ中に35mlの凍結溶液と共に置く。35ml細胞懸濁液は、典型的には、PBS中に $3.5 \times 10^9 \sim 5.0 \times 10^9$ 細胞を含む。等量の凍結溶液(PBS中、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミン)を加える。細胞は最終濃度 50×10^6 細胞/mlである。Cryocyteバッグは、30~70mlの範囲の容量を含み得、そして細胞濃度は、 $10 \sim 200 \times 10^6$ 細胞/mlの範囲であり得る。一旦、Cryocyteバッグに細胞および凍結溶液を充填すると、バッグを、速度を調節された冷凍庫に置いて、そして細胞を、 $1^\circ\text{C}/\text{分}$ で -80°C まで下げて凍結する。次いで、凍結細胞を、液体窒素保存システムに必要なときまで置く。

【0145】

細胞を、液体窒素保存システムから取りだし、そして 37°C において解凍する。次いでDMSOを除くため、解凍した細胞をCOBE 2991システム上でカルシウム不含、マグネシウム不含のPBSを用いて洗浄する。次いで洗浄した細胞を、80ミクロンメッシュフィルターに通す。

【0146】

解凍した細胞(約 0.5×10^9 のCD3⁺細胞)を、100mlのカルシウム不含、マグネシウム不含のPBSを含んだプラスチック製1L Lifecellバッグに置く。このPBSは、1%~5%のヒト血清を含む。 1.5×10^9 CD3×CD28ビーズ(Dynabeads M-450)もまた細胞と共にバッグに置く(3:1 DYNABEADS M-450 CD3/CD28 T:CD3⁺ T細胞)。ビーズと細胞を約30分間1RPM(回転して循環する)で室温で混合する。ビーズと細胞を含むバッグをMax Sep Magnetic Separator(Nexell Therapeutics, Irvine, CA)上に配置する。バッグとMax Sepの間にプラスチックスペーサー(約6mm厚)を配置する。(磁力を増大させるためには、スペーサーを除く。)PBSおよび非結合細胞は、排出されるが、ビーズとビーズに付着した任意の細胞が磁石に保持される。

【0147】

CD3×CD28ビーズおよびビーズに結合した濃縮された細胞は、細胞培養培地(X-Vivo 15を含む1L、BioWhittaker; 熱非働化されたプールされたヒト血清50ml、1M Hepes 20ml、200mM L-グルタミン10mlの

添加、約100,000 I. U. のIL-2の添加また不添加)を用いて3 L Life cell 培養バッグ中にリンスされる。CD3×CD28ビーズおよびポジティブに選択された細胞をLife cell バッグに移した後、培養培地をバッグが1000 mlを含むまで加える。細胞を含むバッグをインキュベーター(37℃および5%CO₂)に置き、そして細胞を増大させる。

【0148】

細胞を3日および5日毎に、1つから4つに分割する。培養の3日後および8日後に、細胞を収集してT細胞活性化および増殖を測定した。T細胞の活性化を、細胞のサイズ、細胞表面マーカー(特に、培養3日目におけるCD25およびCD154の発現)の発現レベル、を測定することによって評価した。8日目において、細胞をMax Sep 磁石上における引力の下で流して(約150 ml/min)、磁石粒子除き、そして上に記載のCOBE装置を用いて細胞を洗浄および濃縮し、そして静脈内投与に適した平衡化電解質溶液(例えば、Plasma-Lyte A(登録商標)(Baxter-Healthcare))に再懸濁する。

【0149】

本明細書中に記載されるように、XCELLERATE ITM は、上記のものと類似の状態をいうが、ただし、刺激および濃縮を行わず、かつ単球欠失を刺激前に行った場合を除く。

【0150】

XCELLERATE ITM プロセスおよびIITM プロセス両方を行い、そしてT細胞増殖を培地中での8日後に測定した。拡大したT細胞の収率は、細胞培養前にCD3⁺細胞を濃縮した場合よりも高かった(表1参照)。さらに、この細胞集団は90%CD3⁺細胞より多くを有した。

【0151】

【表1】

表1. 8日目でのT細胞の収率増大

実験	CD3 ⁺ 非濃縮 (XCELLERATE I TM)	CD3 ⁺ 濃縮 (XCELLERATE II TM)
NDa079	33 × 10 ⁹	36 × 10 ⁹
NDa081	38 × 10 ⁹	42 × 10 ⁹
NDa082	28 × 10 ⁹	38 × 10 ⁹
平均	33 ± 5 × 10 ⁹	39 ± 3 × 10 ⁹

さらなる実験をこの点について行い、そして拡大した細胞の総数、ならびにCD3⁺濃縮なしで刺激した細胞の9つのバッチおよびCD3⁺濃縮して刺激した細胞の5つのバッチのひだ(fold)拡大を表す(図1および図2を参照)。

【0152】

培養前に、磁力の適用によって細胞を濃縮することは、CD3⁺細胞の純度およびCD154レベルを効率的に増加させる(表2、図3および4はCD154レベルを図解的に表す)。さらに、T細胞の集団を異なる強度の磁石に曝す場合、T細胞増殖の比較は、より強い磁石での曝露がより高いCD3⁺細胞の収率を得ることを示した(表2)。

【0153】

【表2】

表2. 弱い磁石および強い磁石を使用した濃縮後のT細胞増殖および細胞表面の比較

実験	磁石	日数	CD3%	サイズ (FSC)	CD25 (MFI)	CD154 (MFI)	CD3# x 10 ⁹
NDa087							
選抜前		0	47%	318	8	4	0.5
選抜後	弱い	0	56%				0.37
選抜後	強い	0	61%				0.35
非選抜	なし	3		533	758	19	
選抜後	弱い	3	90%	570	846	41	
選抜後	強い	3	92%	558	1006	45	
培養後	なし						
培養後	弱い	8	92%	412	110	9	17.7
培養後	強い	8	93%	413	89	7	37.8
NDa089							
選抜前		0	44%	312	6	4	0.5
選抜後	弱い	0	46%				0.39
選抜後	強い	0	55%				0.3
選抜後	弱い	3	83%	589	685	67	
選抜後	強い	3	83%	600	720	115	
培養後	弱い	8	89%	409	58	18	25.3
培養後	強い	8	87%	371	65	13	42.1

表2. (続き)

実験	磁石	CD25 (0日目)	CD25 (3日目)	CD154 (0日目)	CD154 (3日目)	CD3 Cell # (8日目)
		(MFI)	(MFI)	(MFI)	(MFI)	x 10 ⁹
NDa087						
非選抜	なし	8	758	4	19	31
選抜	弱い	8	846	4	41	18
選抜	強い	8	1006	4	45	38
NDa089						
非選抜	なし	6	309	4	12	26
選抜	弱い	6	685	4	67	25
選抜	強い	6	720	4	115	42

5つのさらなる実験を行い、XCELLERATE I^TM プロセスをXCELLERATE II^TM プロセスと比較した。これら2つのプロセスによって活性化した細胞および拡大した細胞について、培養の3日目および8日目の細胞活性マーカー（細胞サイズ、CD25発現およびCD154発現）を以下の表3および図6～7に示す。

表3：3日目における細胞活性化マーカー

【0154】

【表3】

10

20

30

40

実験番号 (ドナー)	プロセス	細胞の大きさ (FSC)		CD25 (MFI)		CD154 (MFI)	
		Day 0	Day 3	Day 0	Day 3	Day 0	Day 3
NDa104 (PC071)	XCELLERATE TM	282	526	7	625	5	50
	XCELLERATE TM II	315	531	7	750	5	162
NDa107 (PC074)	XCELLERATE TM	243	578	5	287	4	23
	XCELLERATE TM II	272	587	6	311	5	120
NDa110 (PC076)	XCELLERATE TM	262	588	6	497	4	59
	XCELLERATE TM II	284	615	6	580	5	197
NDa113 (PC060)	XCELLERATE TM	271	662	5	726	4	54
	XCELLERATE TM II	291	660	6	741	5	177
NDa115 (PC073)	XCELLERATE TM	253	560	6	202	6	25
	XCELLERATE TM II	252	582	6	448	6	83
平均 ± Std Dev	XCELLERATE TM I	262 ± 15	583 ± 50	6 ± 1	467 ± 221	5 ± 1	42 ± 17
	XCELLERATE TM II	283 ± 23	595 ± 47	6 ± 1	566 ± 189	5 ± 1	148 ± 17

10

20

凍結／解凍された細胞を使用して、表 3 中の全ての培養を開始した。

【0155】

表 3 および図 6～7 中のデータは、XCELLERATETM I I^T M プロセスが細胞（3 日目における細胞の大きさおよび CD 25 発現活性化マーカーが平均で類似しているが、刺激の代表的に直後により高くかつより高くなり続ける細胞）を生成したことを示す。しかしながら、XCELLERATETM I I^T M プロセスからの T 細胞に対する 3 日目における CD 154 活性化マーカーは、XCELLERATETM I I^T M プロセスからの T 細胞のものに対する CD 154 活性化マーカーよりも非常に大きかった。さらに、上記に示されるように、XCELLERATETM I I^T M プロセスは、各ドナーで一貫して他の方法よりも高い CD 25 および CD 154 レベルを生成した。

30

【0156】

XCELLERATETM I I^T M プロセスの 3 日目における CD 154 の発現は、実際に XCELLERATETM I I^T M と比較して、より非常に高い。この観測は、XCELLERATETM I I^T M プロセス中よりも、XCELLERATETM I I^T M プロセスの間、T 細胞はより高い活性化状態にあることを示す。これが、インビボにおいて投与される場合、より有効な産物へ翻訳し得ることが予測される。

【0157】

CD 3⁺ 細胞純度、CD 4 細胞／CD 8 細胞比、および 3 日目における培養物中の細胞の生存率をまた、5 人の患者サンプルについて決定した。XCELLERATETM I I^T M プロセスおよび XCELLERATETM I I^T M プロセスにかけて使用した細胞の表現型および生存率を、フローサイトメトリーまたはトリパン青染色によって測定されたように、以下の表 4 において示す。

40

表 4

【0158】

【表 4】

NDA#	0日目のCD3 ⁺ 細胞純度 (%)	0日目の細胞 生存率 (%)	0日目の CD4:CD8 ψ 平均	3日目のCD3 ⁺ 細胞純度 (%)	3日目の細胞 生存率 (%)	3日目の CD4:CD8 ψ
103 XCELLERATE I	70	92	1.91	79	82	1.3
103 XCELLERATE II	83	99	2.3	91	95	2.4
104 XCELLERATE I	67	95	3.2	84	78	2.7
104 XCELLERATE II	110	99	3.7	93	87	2.9
107 XCELLERATE I	69	99	2.3	85	82	2.3
107 XCELLERATE II	119	99	2.7	95	92	2.8
110 XCELLERATE I	63	99	2.9	91	82	2.6
110 XCELLERATE II	83	99	3.9	93	92	4.5
115 XCELLERATE I	60	99	1.9	92	91	2.7
115 XCELLERATE II	72	99	2.2	96	94	2.8

* = XCELLERATE I プロセスにおける単級除去後、またはXCELLERATE II プロセスにおける磁気濃縮後、0日目におけるCD3⁺T細胞の純度
 ψ = XCELLERATE I プロセスにおける単球除去後、またはXCELLERATE II プロセスにおける磁気濃縮後、0日目におけるCD4⁺細胞：CD8⁺細胞の比
 (実施例 I I)

(CD3⁺細胞集積、単球除去および顆粒球除去の効率)

この研究に関して、Xcyte Therapies Development laboratoryでの受取り時に、受け入れるPBMCアフレーション産物を洗浄し、分割しそして：

1. XCELLERATE I プロセスについて、単球除去工程を実行し、そしてCD14⁺単球除去PBMCを低温保存し、そしてLN₂フリーザーの蒸気相中で保存した(実施例 I において示されるように)。XCELLERATE I プロセスの準備(set-up)の日に、実施例 I に詳述したように、CD14⁺単球除去されたPBMCを解凍し、そしてDYNABEADS M-450 CD3/CD28 Tを用いて、XCELLERATEプロセスを開始した。これらの開始工程におけるN=5ドナーについての、平均的な細胞組成およびCD3⁺T細胞集積、CD14⁺単球除去および顆粒球除去の平均的な効率を表5. 1に示し、各々の個々のドナーに関するデータを表5. 2に示す。

【0159】

2. XCELLERATE II プロセスについて、PBMCアフレーション産物細胞を低温保存し、そしてLN₂フリーザーの蒸気相中で保存した。XCELLERATE II プロセスの準備の日に、実施例 I に詳述したように、低温保存されたPBMCアフレーション産物細胞を解凍し、そしてDYNABEADS M-450 CD3/CD28 Tを用いて、XCELLERATE II プロセスを開始した。これらの開始工程におけるN=5ドナーについての、平均的な細胞組成およびCD3⁺T細胞集積、CD14⁺単球除去および顆粒球除去の平均的な効率を表5. 1に示し、各々の個々のドナーに関するデータを表5. 2に示す。

【0160】

表5. 1および表5. 2に示されるように、XCELLERATE IIプロセス構成 (configuration) における解凍されたPBMCアフェレーシス産物から導かれる、 $CD3^+$ T細胞の磁気濃縮前の、PBMCアフェレーシス産物の凍結／解凍の組み合わせは、 $CD14^+$ 単球および顆粒球の効果的排除をもたらす (表5. 1および表5. 2)。XCELLERATE IIプロセスにおける $CD14^+$ 単球および顆粒球の排除の効率は、さらなる「コーティングされていない」DYNABEADS M-450 T試薬を使用して個別の除去工程に対する必要性を排除し、そして一貫してより高い $CD4/CD8$ 比を導く利点を有するXCELLERATE IIプロセスと、同程度良好である。

10

【0161】

表5. 1: XCELLERATE IおよびXCELLERATE IIプロセス構成の初期工程における $CD3^+$ T細胞集積、 $CD14^+$ 単球除去および顆粒球除去の平均的 (N = 5) 効率。

【0162】

【表5】

細胞の調製	平均 ± Std. Dev. 細胞組成 (%)			
	$CD3^+$	$CD14^+$	顆粒球	$CD4/CD8^+$
受け入れPBMC アフェレーシス産物	49 ± 6	16 ± 3	8 ± 7	2.2 ± 0.3
XCELLERATE I				
単球除去PBMC	51 ± 6	5.5 ± 3	5.7 ± 5	2.4 ± 0.6
凍結/解凍単球除去 PBMC	64 ± 4	6 ± 3	0.4 ± 0.5	2.4 ± 0.6
XCELLERATE II				
凍結-解凍PBMC アフェレーシス産物	56 ± 5	11 ± 2	0.4 ± 0.5	2.4 ± 0.8
後の $CD3^+$ 磁気濃縮	92 ± 22	2.4 ± 3.7	0 ± 0	2.86 ± 0.86

20

30

細胞組成は、標準的プロトコルに基づいて、フローサイトメトリーによって決定した。

【0163】

(表5. 2: XCELLERATE IおよびXCELLERATE IIのプロセス構成の開始工程における $CD3^+$ T細胞濃縮、 $CD14^+$ 単球除去および顆粒球除去の効率の比較)

【0164】

【表6】

Table 5.2:

実験番号 (ドナー)	細胞調製	細胞の組成(%)			
		CD3*	CD14*	顆粒球	CD4/CD8*
NDa104 (FC071)	入手した(Incoming) PBMCアフェレーシス産物	43%	11%	14%	2.2
	XCELLERATE I				
	単球を除去したPBMC	54%	5%	12.5%	3.2
	凍結/融解され、単球を除去したPBMC	67%	4%	0%	3.2
	XCELLERATE II				
	凍結/融解されたPBMCアフェレーシス産物	64%	7%	0%	3.1
	ポスト(post)CD3* 磁気選別	110%	1%	0%	3.7
NDa107 (FC074)	入手したPBMCアフェレーシス産物	51%	16%	1%	2.1
	XCELLERATE I				
	単球を除去したPBMC	64%	5%	1%	2.3
	凍結/融解され、単球を除去したPBMC	69%	3%	0%	2.3
	XCELLERATE II				
	凍結/融解されたPBMCアフェレーシス産物	55%	11%	0%	2.0
	ポストCD3* 磁気選別	120%	0%	0%	2.7
NDa110 (FC076)	入手したPBMCアフェレーシス産物	44%	18%	15%	2.5
	XCELLERATE I				
	単球を除去したPBMC	63%	3.5%	10%	2.9
	凍結/融解され、単球を除去したPBMC	63%	7%	0%	2.9
	XCELLERATE II				
	凍結/融解されたPBMCアフェレーシス産物	55%	13%	0%	3.2
	ポストCD3* 磁気選別	83%	1%	0%	3.8
NDa113 (FC060)	入手したPBMCアフェレーシス産物	47%	17%	6%	2.3
	XCELLERATE I				
	単球を除去したPBMC	61%	4%	3%	1.8
	凍結/融解され、単球を除去したPBMC	63%	4%	1%	1.8
	XCELLERATE II				
	凍結/融解されたPBMCアフェレーシス産物	51%	13%	1%	1.5
	ポストCD3* 磁気選別	76%	1%	0%	1.9
NDa115 (FC073)	入手したPBMCアフェレーシス産物	59%	17%	2%	1.7
	XCELLERATE I				
	単球を除去したPBMC	60%	10%	2%	1.8
	凍結/融解され、単球を除去したPBMC	60%	11%	1%	1.9
	XCELLERATE II				
	凍結/融解されたPBMCアフェレーシス産物	53%	12%	1%	2.0
	ポストCD3* 磁気選別	72%	9%	0%	2.2

細胞の組成物を標準的プロトコルに従ってフローサイトメトリによって決定した。

【 0 1 6 5 】
C D 1 4 ⁺ 単球除去の工程を除くことによるプロセスの単純化および合理化ならびにこれらの関連試薬に加えて、X C E L L E R A T E I I ^{T M} プロセスにおける磁気濃縮 (m a g n e t i c c o n c e n t r a t i o n) 工程もまた、T細胞活性化の開始時により高純度のC D 3 ⁺ T細胞、およびC D 3 ⁺ C D 4 ⁺ : C D 3 ⁺ C D 8 ⁺ がより高割合のT細胞を提供した(表5. 1および表5. 2)。

【 0 1 6 6 】
XCELLERATE I^TM プロセスおよびXCELLERATE I I^TM プロセス
の 8 日目に予め収集された活性化 C D 3⁺ T 細胞の収率、純度、生存度および組成をまた
比較した。

【 0 1 6 7 】

表 5. 3 に示されるように、8 日目の収集前の CD 3⁺ T 細胞の平均収率、純度および生存度は、代表的に X C E L L E R A T E I^T M プロセスと比較して X C E L L E R A T E I^T M プロセスについて増加した。

【 0 1 6 8 】
(表 5. 3 : X C E L L E R A T E I ^T M プロセスおよび X C E L L E R A T E I I 50

^{T M} プロセスの 8 日目に予め収集された活性化 $CD3^{+}$ T 細胞の収率、純度、生存度および組成)

【0169】

【表 7】

Table 5.3:

実験番号 (バー)	XCELLERATE プロセス 構成	予め収集した $CD3^{+}$ T-細胞産物の調製物			
		$CD3^{+}$ T- 細胞数	CD3 ⁺ T- 細胞の 純度 (%)	生存度 (%)	CD4/CD8 割合*
NDa104 (PC071)	XCELLERATE I	65×10^9	95	97	1.2
	XCELLERATE II	50×10^9	97	97	1.7
NDa107 (PC074)	XCELLERATE I	57×10^9	98	98	0.8
	XCELLERATE II	52×10^9	98	98	1.5
NDa110 (PC076)	XCELLERATE I	41×10^9	96	96	1.6
	XCELLERATE II	41×10^9	99	99	2.4
NDa113 (PC060)	XCELLERATE I	41×10^9	96	96	1.3
	XCELLERATE II	43×10^9	98	98	2.0
NDa115 (PC073)	XCELLERATE I	31×10^9	96	96	1.3
	XCELLERATE II	48×10^9	97	97	1.4
Average ± Std Dev	XCELLERATE I	47 ± 14	96 ± 2	97 ± 1	1.2 ± 0.3
	XCELLERATE II	45 ± 6	98 ± 1	98 ± 1	1.8 ± 0.4

* = $CD3^{+}$ $CD4^{+}$: $CD3^{+}$ $CD8^{+}$ T 細胞の割合。

【0170】

また、表 5. 3 に示すように、XCELLERATE I I^{T M} プロセスは、このプロセスの間中、 $CD3^{+}$ $CD4^{+}$: $CD3^{+}$ $CD8^{+}$ T 細胞のより高い割合を維持する。これは、磁気濃縮 (magnetic concentration) 工程間の $CD3^{+}$ $CD4^{+}$ 細胞の優先 (preferential) 濃度に起因し得る (表 5. 1 および表 5. 2)。

【0171】

「入手した (incoming)」とは、新鮮な、洗浄して入手したアフレーション細胞をいう。XCELLERATE I I^{T M} プロセスについて表 5. 2 に列挙した開始細胞は、洗浄し、単球を除去し、そして/または凍結/融解したアフレーションされた細胞であった。XCELLERATE I I^{T M} プロセスについて表 5. 2 に列挙した開始細胞は、洗浄して凍結/融解したアフレーション細胞であった。

【0172】

* = $CD3^{+}$ $CD4^{+}$: $CD3^{+}$ $CD8^{+}$ T 細胞の割合。

【0173】

表 5. 3 は、XCELLERATE I I^{T M} プロセスが、XCELLERATE I I^{T M} プロセスからの細胞産物よりも純粋 ($CD3^{+}$ 細胞%を考慮して) である細胞産物を生じることを示す。すなわち、XCELLERATE I I^{T M} プロセスからの産物細胞では、平均 (±標準偏差) $CD3^{+}$ 細胞純度が $96\% \pm 1\%$ であり、一方、XCELLERATE I I^{T M} プロセスからの細胞では、平均純度が $93\% \pm 2\%$ であった。

【0174】

また、表 5. 3 に示すように、XCELLERATE I I^T M プロセスは、CD 4 / CD 8 細胞のより高割合を維持した。入手した細胞では、平均 CD 4 / CD 8 細胞の割合が 2. 2 のであり、そして XCELLERATE I I^T M プロセスからの産物細胞では、CD 4 / CD 8 割合が 1. 8 であり、一方、XCELLERATE I^T M プロセスからの産物細胞では、CD 4 / CD 8 割合が 1. 2 であった。

【0175】

表 5. 3 のデータはまた、XCELLERATE I I^T M プロセスでは、平均生存度が 98 % の産物細胞を得、一方、XCELLERATE I^T M プロセスでは、平均生存度が 97 % の産物細胞を得た。

【0176】

(実施例 I I I)

(単球除去)

単球 (CD 14⁺ 食細胞) を、種々の「無関係な (irrelevant)」(すなわち、非抗体でコートされたかまたは非標的抗体でコートされた) Dynal ビーズを用いて磁気除去 (magnetic depletion) を介して T 細胞調製物から除去した。除去を、およそ 2 : 1 の細胞に対するビーズの割合で、Dynal ヒッツ抗マウス M-450 ビーズ、または Dynal ヒト血清アルブミンコートされたビーズ (M-450)、または Dynal Epoxy (M-450) ビーズとともにフィコールにおける分離後の全血液またはアフエレスされた末梢血液のいずれかをプレインキュベートすることによって実施した。これらの細胞およびビーズを、22 ~ 37 °C にて 1 ~ 2 時間インキュベートし、次いで、ビーズに接着したかまたはビーズを取り込んだ細胞の磁気除去を行った。残りの細胞を、未処置の細胞と平衡して培養下に置いた。細胞を、除去前および除去後の細胞の表現型についてフローサイトメトリによって特徴付けた。

【0177】

(実施例 I V)

(フローサイトメトリー設定)

Becton Dickinson FACSCALIBUR サイトメータは、収集されたデータおよび提示されたデータの全てに有用であった。3 色分析を実施し得るいずれかのフローサイトメータは、同一データ必要とする熟練の操作者によって用いられ得る。例えば、FACSCAN、Vantage Cell Sorter、または他の BD 製品は、類似のデーターを収集するために機能する。また、Coulter 製品 (例えば、Coulter Epic Sorter) も同様に機能する。

【0178】

以下に与えられる機器の設定は、これらの研究を実施したように、データを収集するための機器の適合のために一般的なガイドラインとして用いられ得る。これらの設定を本明細書中に提供される実施例のために用いる ; しかし、これらの設定の変更は、熟練した機器操作者によって補正 (compensation) および検出電圧を適切に調整され得るし、このようにされるべきである。また、異なる蛍光タグを有する異なる検出抗体の使用は、他のチャンネル (channel) (例えば、補正) に、最小の「浸出オーバー (bleeding-over)」で最適シグナル分離 (電圧) を与えるように任意の特定の機器に対して固有の調整を必要とする。補正コントロール (control)、アイソタイプコントロール、を使用することを熟知しており、T 細胞の生物学を一般的に理解している、熟練したフロー操作者は、以下に提示されたデータのいずれかを再現し得るべきである。

【0179】

さらに留意すべき点としては、種々の設定 (特に電圧設定) は、機器のレーザーの効率に依存して変化させてもよい。例えば、より古いレーザーは、より新しいレーザーと比較してシグナルを生じるために、より高い電圧を必要とし得る。しかし、得たデータは (電圧が高かろうが低かろうがいずれにしても)、生物学的に同様のパターンを示すべきである。

10

20

30

40

50

【0180】

FACSCALIBURTM (Becton Dickinson) で用いられた設定は、以下である：

検出器／増幅器：

パラメーター	検出器	電圧	増幅器／ゲイン	モード
P1	FSC	EOO	1.30	Lin
P2	SSC	370	1.00	Lin
P3	FL1	610	1.00	Log
P4	FL2	550	1.00	Log
P5	FL3	520	1.00	Log。

10

【0181】

パラメータの電圧は、一般的に一定であるが、P3、P4、およびP5は、対数（log）モードのシグナル強度で最初の10進（0～10）内かまたは付近で陰性のコントロールシグナル値を維持しながら、最大シグナル分離に達するようにわずかに上げたり下げたりして調整してもよい。

【0182】

閾値：

第1パラメーター：FSC（順方向散乱）

値：52

第2パラメーター：なし

20

補正（Compensation）：

FL1－4.0% FL2

FL2－21.4% FL1

FL2－2.6% FL3

FL3－15.2% FL2。

【0183】

これらの設定が以下に提示されるデータのほとんどを収集するために用いられる設定の近似を提供した場合、これらの設定を変更してもよく、刺激したT細胞において、おおよそ等価なデータを生じるべきである。上に列挙した電圧での補正について、一般に受容可能な範囲は、以下に示す通りである：

30

FL1－FL2 0.4－4%

FL2－FL1 18－27%

FL2－FL3 2－8%

FL3－FL2 10－16%

特定の補償または電圧値の決定を、以下の目的でフローサイトメトリーオペレーターで実験することによって行った：

1) 電圧：陽性シグナルと陰性シグナルとの間のシグナル分離の最大値（例えば、表面抗原マーカー陰性対低レベル表面抗原対高レベル表面抗原）

2) 補償：補償制御の使用による内部チャンネル相互作用（出血過剰）の最小化。

【0184】

40

電圧設定を変更する場合、補償の設定も同様に変更する。

【0185】

（実施例V）

（細胞増殖および細胞生存率アッセイ）

細胞増殖および細胞生存率を、標準トリパンブルー染色および、血球計算盤を使用して細胞を数えることによって測定した。図5A～5Bを参照のこと。

【0186】

（実施例VI）

（活性化マーカーアッセイ）

CD154は、時間的な様式で活性化されたT細胞上で発現され、APCに対するCD4 50

0を介したT細胞相互作用における鍵の要素として示される。これらの2つのレセプターの相互作用を遮断することによって、免疫応答を効果的に変更し、そして遮断さえし得る。CD3 x CD28常磁性ビーズでの集中によって刺激されるT細胞のアリコートを、3日目、5日目、および8日目の細胞培養物から除去し、そしてCD154発現のレベルについて分析した。このCD154発現のレベルを、単球が枯渇しているがCD3 x CD28常磁性ビーズでインキュベートしていないT細胞（すなわち、このT細胞は、培養開始で磁性的に集中されていない）と比較した。抗CD3ビーズおよび抗CD28ビーズでの磁性的な集中によって刺激されたT細胞の非常に大きな活性化で、培養開始時に同様に刺激されていない細胞と比較して、培養の3日目のCD154発現のレベルにおいて3倍上昇することを示した。（図4および図7を参照のこと）。同様の様式で測定されたCD25レベル（図6）は、より高い活性に向かう傾向を示す。

10

【0187】

一般に、マーカーの発現は、種々の時間にわたってモニターされた。この点において、細胞を、抗ヒトCD4（Immunotech、Fullerton、CA）、FITC結合抗ヒトCD11a（Pharmingen）、FITC結合抗ヒトCD26（Pharmingen）、FITC結合抗ヒトCD49d（Coulter）、FITC結合抗ヒトCD54（PharmingenおよびBecton Dickinson）、FITC結合抗ヒトCD95（Pharmingen）、FITC結合抗ヒトCD134（Pharmingen）、FITC結合抗ヒトCD25Ab（Becton Dickinson、Fullerton、CA）、FITC結合抗ヒトCD69Ab（Becton Dickinson）、FITCまたはPE結合抗ヒトCD154Ab（Becton Dickinson）、あるいはFITCまたはPE結合IgG1アイソタイプコントロールAbで標識する。細胞の 2×10^5 を、20分間4℃で、30 μ lの最終量中のそれぞれの抗体の2 μ lで標識し、洗浄し、そして1%パラホルムアルデヒド（Sigma、St. Louis、MO）中に再懸濁した。

20

【0188】

細胞の表面マーカー分子発現レベルの比較を、種々の方法によって実行し、そして従って絶対値は変化し得る。しかし、2つの値を比較した場合、この相対倍の値は容易に計算し得る。例えば、異なる「活性化」方法によって産生されたT細胞のCD154発現レベルは、フローサイト方法によって比較的正確に測定され得る。例えば、Becton Dickinsonの抗CD154-PE結合体（カタログ番号340477）のような試薬を使用して、休止期または活動期のT細胞を染色し得、そしてこのマーカー（またはフローサイトメーター操作で実験される周知の他のもの）についての発現レベルを評価し得る。T細胞、すなわちCD4⁺およびCD8⁺の両方に対するCD154の上昇した発現レベルを提供する方法が本明細書中に記載される。本明細書中に記載されるように、培養開始時に、同時にT細胞を刺激して集中することによって、発現レベルは標準3 x 28活性化によって得られる値、すなわちおよそ20%から100%以上の上昇レベル（フローサイトメトリー（BD FACSCaliburおよび上記に記載される抗体）を使用する平均蛍光強度（MFI）によって測定されるような）を越えて跳ね上がる。例えば、刺激されないCD4⁺T細胞は、CD154について陰性であり、そして従って1~10の間のMFI値を得る。XCELLERATE I^TMによる活性化の際、活性化後3日目に、CD154に対するCD4⁺T細胞についてのMFI値は、20~40の範囲であり得、XCELLERATE I^TMプロセスは、60~200のCD154 MFI値を得た。T細胞で発現するCD154分子の数から考えると絶対値は存在しない一方、上昇する発現の相対レベルを測定するための十分な量が存在する。従って、XCELLERATE I^TMプロセスと比較して、XCELLERATE I^TMプロセスが、活性化後1~4日の間のCD154レベルにおいておよそ1.1~20倍の上昇を実証し得ることを実証し得る。

30

40

【0189】

（実施例V I I）

50

(サイトカインアッセイ)

細胞を、上記に記載するように調製する。種々の時間刺激した細胞由来の上清を、製造者指示書 (Biosource International, Sunnyvale, CA) に従う IL-2、IL-4、INF- γ または TNF- α ELISA に供した。

【0190】

代替のアッセイにおいて、IL-2を、フローサイトメトリーを使用してCD4 T細胞の細胞内染色によって測定する。IL-2またはINF- γ の細胞内標識のために、細胞を最初に $1\mu\text{g/ml}$ のMonensin (Calbiochem) でアッセイ前の4時間インキュベートする。この細胞を、続いて上記に記載されるように表面タンパク質について染色し、固定し、Becton Dickinson細胞内染色キットを使用して透過処理し、PE結合抗ヒトIL-2 AbおよびFITC結合抗ヒトINF- γ もしくは製造業者によって記載されるような対応するコントロールAbで標識する。データ収集およびフローサイトメトリー分析は、製造者プロトコル (Becton Dickinson) に従ってCellquestソフトウェアを使用するBecton Dickinson FACS Caliburフローサイトメーターで実行する。

10

【0191】

INF- γ 集中は、XCELLERATE IITM 方法論を使用する場合、XCELLERATE IITM と反対に、3日目で約2倍、3倍、4倍およびいくつかの場合5倍高かった (データは示さない)。さらに、TNF- α レベルはまた、XCELLERATE IITM と比較した場合、刺激後5日目まで、著しく高かった (1.5倍~3倍の間より高い) (データは示さない)。

20

【0192】

(実施例VII)

(再構築後の表現型細胞分析)

再構築分析のために、約 5×10^6 個の細胞を、終了日の培養から採取する。いくつかの実施例において、終了日は培養の8日目である。この細胞を5mLの、X-vivo15培地 (血清を有し、およびIL-2を含むかまたはIL-2を含まない) 中に、上記に示すように6ウェルプレートの1ウェルにプレートする。約 5×10^6 Dynabeads M-450 CD3/CD28 Tを、細胞を含むウェルに数珠繋ぎにし、そして細胞およびビーズを37℃、5%CO₂ インキュベーター中に配置する。2日後、このサンプルを除去し、生存率について試験し、そしてFACSによって細胞の大きさ、ならびに細胞マーカーおよび/またはサイトカイン発現レベル (例えば、CD25発現レベル、CD154発現レベル) を測定する。表6は、XCELLERATE IITM プロセスおよびXCELLERATE IITM プロセスに対する5つの患者サンプル被験体についての以下のこれらの結果を実証する。

30

【0193】

【表8】

表6: XCELLERATE I™およびXCELLERATE II™を使用する

XCELLERATED T細胞についての再構築アッセイの結果

実験番号 (ドナー)	プロセス構成	細胞の大きさ (FSC)		CD25 (MFI)		CD154 (MFI)	
		T=0	T=48 時間	T=0	T=48 時間	T=0	T=48 時間
NDa104 (PC071)	XCELLERATE I	393	607	104	478	6	37
	XCELLERATE II	404	659	115	544	12	70
NDa107 (PC074)	XCELLERATE I	386	596	59	585	6	121
	XCELLERATE II	380	607	62	721	10	109
NDa110 (PC076)	XCELLERATE I	425	501	111	600	10	39
	XCELLERATE II	390	445	97	434	15	36
NDa113 (PC060)	XCELLERATE I	399	630	66	659	8	32
	XCELLERATE II	411	633	113	816	12	145
NDa115 (PC073)	XCELLERATE I	433	514	105	247	13	10
	XCELLERATE II	408	569	81	369	20	36
平均 ± Std Dev (n=5)	XCELLERATE I	407 ± 21	570 ± 58	89 ± 24	514 ± 163	9 ± 3	48 ± 43
	XCELLERATE II	399 ± 13	583 ± 84	94 ± 22	577 ± 189	14 ± 4	79 ± 48

(実施例 IX)

(代替的な細胞収集および細胞培養プロトコル XCELLERATE™)

ヒト血液から単離した細胞を、X-vivo培地 (Biowhittaker Inc., Walkersville, MD) 中で増殖させ、そして、これは20U/mlのIL-2 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) が補充されたかまたはされない使用、ならびに5%ヒト血清 (Biowhittaker)、2mMグルタミン (Life Technologies, Rockville, MD) および20mM HEPES (Life Technology) を補充された使用に依存する。Jurkat E6-1細胞 (ATCC, Manassas, VA) を、10% FBS (Biowhittaker)、2mMグルタミン (Life Technologies)、2mMペニシリン (Life Technologies)、および2mM

Mストレプトマイシン (Life Technologies) を補充した RPMI 1640 (Life Technologies) 中で、増殖する。

【0194】

健康なヒトの自発的なドナーからの軟膜を得る (American Red Cross, Portland, OR)。末梢血単核細胞 (PBMC) を、製造者の指示書に従った Lymphocyte Separation Media (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) を使用して得る。

【0195】

末梢血リンパ球 (PBL) を、培養フラスコ (Costar, Pittsburgh, PA) 中のコートしてない Dynabead (Dynal, Oslo, Norway)、 10^8 細胞/ml、2 ビーズ/細胞、 37°C 、2 時間で用いたインキュベーションにより PBMC フラクションから得る。単球およびマクロファージを、培養フラスコへの粘着性によって取り除き得る。あるいは、これらを、常磁性ビーズを貪食すること、そして次ぐ、製造者による指示書 (Dynal) に従った磁氣的細胞分離によるこれらの細胞除去によって取り出し得る。CD4+細胞を、CD8 (クローン G10-1)、CD20 (クローン IF5)、CD14 (クローン F13) および CD16 (Coulter) に対する $10\mu\text{g/ml}$ のモノクローナル抗体を、 10^8 細胞/ml、 4°C 、20 分で用いたインキュベーションすることによって、PBL フラクションから得る。洗浄後、細胞を、ヒツジ抗マウス Ig 結合 Dynabead (10^6 細胞/ml、6 ビーズ/細胞、 4°C で 20 分) を用いて処理し、そして、次いで、磁気性細胞分離を介して 2 度除去する。CD4+細胞の純度は、フローサイトメトリーによって測定すると約 91~95% である。

【0196】

樹状細胞を、 10^8 細胞/ml、2 時間、 37°C (Dynabead なし) で、培養フラスコ (Costar) に対する PBMC の第 1 の接着化により生成する。広範囲な洗浄後、接着した T 細胞を、 500U/ml の GM-CSF (Boehringer Mannheim) および 12.5U/ml の IL-4 (Boehringer Mannheim) を含む培地中で 7 日間培養する。得た細胞集団は、微弱な接着性であり、そして樹状細胞 (例えば、HLA-DR、CD86、CD83、CD11c を発現し、そして CD4 の発現を欠損する) の表面マーカー特性を発現する (全抗体を、Becton Dickinson, San Jose, CA から得た)。

【0197】

他の技術は、組織培養プレートおよび/もしくは組織培養フラスコ (Baxter bags)、または培地 (これは、RPMI、X-Vivo 15、またはいくつかの他の T 細胞培養培地を含む) 中の他の通常の培養ベッセル中でインキュベーションした T 細胞を含むヒト末梢血リンパ球を使用する。T 細胞の活性化および T 細胞増殖について必要とされないが、グルタミンおよび HEPES を、培養培地に添加する。ウシ胎仔血清 (最終的に 10%)、ヒト A/B 血清 (5%)、または自系ヒト血清 (5%) を培養培地に添加した。血清のパーセンテージを、T 細胞の生態または T 細胞の培養結果に多大な影響を与えることなしに変化し得る。いくつかの例において、組換えヒト IL2 を、培養物に添加する。いくつかの例において、食作用 CD14+細胞および他の食作用細胞を、既述の磁氣的除去によって取り出し、抗 CD3 および抗 CD28 (3×28 ビーズ) を表面上に固定したビーズを、3:1 のビーズ対細胞比で添加する。培地を、5~7% CO_2 において 37°C で維持する。細胞を、14 日間に亘るいくつかの時点において取出し、細胞密度 (細胞数)、細胞サイズ、および種々の表面抗原のフローサイトメトリー分析を介して測定した細胞表面の表現型を決定した。上清をまた、培地から回収し以下を含むがこれらに限定されないサイトカインの分泌プロファイルを決定した: IL-2、IL-4、IFN- γ 、TNF- α 。活性化された細胞が増殖して分裂するに従って、培地を、 $0.2\sim 2\times 10^6$ CD3+T 細胞/ml で維持する。T 細胞密度が、約 1.5×10^6 /ml を超過した場合、培地を分割して、そして新鮮な培地を、 $0.2\sim 1.4\times 10^6$ /ml 範囲で細胞密度を与えるように供給する。最初の刺激後の約 14 日間について約 2 時間、活性化され

たT細胞がより静止した (q u i e s c e n t) 相 (例えば、C D 2 5 レベルの漸減し、前方散乱により決定された細胞サイズが漸減し、細胞分裂速度を減少し得る) に入ろうとする場合、細胞を、この被験体に注入するか、または以下の刺激うちのいずれか1つを用いて再刺激する：

- 1) 刺激なし
- 2) $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のフィトヘマグルチニン (P H A)
- 3) 1 : 1 のビーズ対細胞比での (3×28 ビーズ)。

細胞を再び、細胞表現型および活性化/機能的状態について長期間にわたり分析した。上清は、選択されたサイトカイン分析のために再度回収される。細胞3つの異なった方法論で刺激する：1) 製造者による指示書 (D y n a l) に従って抗C D 3 (O K T - 3) 抗体および抗C D 2 8 (9 . 3) 抗体 (3×28 ビーズ) に共有結合的に結合したD y n a b e a d (M - 4 5 0)、3ビーズ/細胞、2) I o n o m y c i n (C a l b i o c h e m, L a J o l l a, C A) ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) およびホルボール12-ミリスチン酸-13-酢酸 (P M A) (C a l b i o c h e m) ($10 \text{ ng}/\text{ml}$)、3) 同種異系の樹状細胞 (25, 000 樹状細胞/200, 000 C D 4 細胞)。全ての細胞を、濃度 10^6 細胞/ ml で刺激する。増殖アッセイを、96ウェル平底プレートにおいて4連で実施する。細胞を、 $200 \mu\text{l}$ の最終容量中 10^6 細胞/ ml で刺激する。増殖を、M T T アッセイ (M T T アッセイキット, C h e m i c o n I n t e r n a t i o n a l I n c., T e m e c u l a, C A) を、第3日 (刺激方法1および刺激方法2) または第6日 (刺激方法3) において実施し、そして結果を、この4連の平均値として表現する。P B L 培地または精製されたC D 4⁺ 細胞培地を、 3×28 ビーズ、i o n o m y c i n / P M A、または同種異系の樹状細胞を用いて刺激した。

【0198】

図8A~8Bで説明したように、細胞数 (C o u l t e r c o u n t e r) は、P H A、ヒツジ抗マウス (S A M) を介してこのビーズに結合した 3×28 ビーズ (ビーズ上の抗C D 3 および抗C D 2 8 同時免疫化)、このビーズに共有結合的に連結した抗体を有する 3×28 ビーズ、またはプレート上に1つまたは2つで固定された抗体を用いて刺激した後、劇的に増加する。図9はまた、(+/- 単球除去および +/- 20 単位の I L - 2 で) ビーズ上に共有結合的に固定化された抗C D 3 および抗C D 2 8 を用いた刺激の後の細胞数の増加を説明する。

【0199】

(実施例X)

(磁氣的除去を介した単球除去)

単球 (C D 1 4 + 食作用細胞) を、種々の「関連性のない」(すなわち、コートされた非抗体またはコートされた非標的抗体) D y n a l ビーズを使用して、磁氣的除去を介してT細胞調製物から取り出す。フィコール化 (f i c o l l e d) 血液全体または血漿交換された末梢血を、ビーズ対細胞比が約2 : 1 のD y n a l ヒツジ抗マウスM - 4 5 0 ビーズ、もしくはD y n a l ヒト血清アルブミン被膜 (a l b u m i n c o a t e d) ビーズ (M - 4 5 0)、または1~2時間の期間中 $22 \sim 37^\circ\text{C}$ でD y n a l E p o x y (M - 4 5 0) ビーズを用いたブレインキュベートすることによって、除去を実施し、その後、ビーズまたは取り込まれたビーズに対して付着する細胞の磁氣的な除去を行った。残余細胞を、未操作の細胞の傍らの培養物中に静置した。細胞を、除去の前後の細胞表現型に対するフローサイトメトリーによって特徴付けた。図9は、単球の非存在下での増大した増殖を説明する。

【0200】

(実施例XI)

(活性化前および活性化後の動力学的タイムコース研究)

1連の実験を、種々の条件下で培養された、全血または除去した末梢血由来のヒトT細胞において実施した。これらの条件を以下に挙げる：

- 1) 刺激なし。

- 2) $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のフィトヘマグルチニン (PHA) で刺激。
- 3) 3:1 または 1:1 のビーズ対 T 細胞比において 3×28 Dynabead (抗 CD3 および抗 CD28 に結合化されたビーズを有するビーズ) で刺激。
- 4) 外因的に添加された $10 \text{ U}/\text{ml}$ ($5 \text{ ng}/\text{ml}$) の組換えヒト IL-2 存在下または非存在下における刺激または培養。
- 5) 単球 (CD14⁺ 食細胞) の存在下での培養、または種々の「無関係な」ダイナビーズを使用して磁気性欠乏を介して上述の細胞の除去後に培養された単球 (CD14⁺ 食細胞) の存在下での培養。欠乏は、実施例 2 に例示されるように実施された。

【0201】

以下の細胞表面マーカーを、フローサイトメトリによって分析して、細胞表現型および活性状態を決定した: CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD45RA, CD45RO, CD54, CD62L, CDw137 (41BB), CD154. 細胞サイズはまた、フローサイトメトリを介する順方向散乱プロフィールによって決定されるように、試験される。

【0202】

マーカー (例えば、CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD45RA および CD45RO) は、T、B および単球系列ならびに亜集団を決定するために使用するが、順方向散乱、CD25, CD65L, CD54, CD137, CD154 は、細胞の活性化状態および機能的性質を決定するために使用される。

【0203】

T 細胞を含むヒト末梢血リンパ球は、実施例 IX に記載するように調製された。細胞を、細胞型および活性化状態/機能的状態に対して長時間分析する。上清を、分泌サイトカイン分析のために回収する。図 8 および 9 は、 $10 \text{ U}/\text{ml}$ の 3×28 ビーズ+/-組換えヒト IL-2 および +/-単球欠乏での活性化後のヒト T 細胞の一般的な増殖性質を示す。全ての細胞を Baxter Lifecell フラスコ (300 ml) 中で培養した。1 プロット標識化「スケールアップ」は、Baxter Lifecell 13 リットル フラスコまで拡張した 300 ml フラスコ培養 (IL-2/欠乏した単球) を示す。このグラフは、種々の条件下でのヒト T 細胞の約 $2-4 \log$ 拡張を示す。

【0204】

図 10 は、長時間の順方向散乱フリーサイトメトリープロフィールによって決定されるような細胞サイズの動力学的な分析を示す。T 細胞を、活性化直後にサイズの増大、および続くサイズの減少を示し、その結果 14 日まで、これらは、静止状態を示す、より小さい順方向散乱フリーサイトメトリープロフィールを示す。

【0205】

図 11 は、 3×28 ビーズ刺激後に長時間の IL-2 発現 (CD25) を示す。CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞の両方は、レセプターレベルにおいて早い増加を示す。14 日まで、CD25 発現レベルは、より静止状態を示す、T 細胞の過半数を一般に減少する。

【0206】

3×28 刺激 T 細胞が、より静止状態 (低い CD25、低い順方向散乱) になった場合、これらは、以下に示されるように再刺激された。

- 1) 刺激なし。
- 2) PHA $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。
- 3) 1 ビーズ/CD3⁺ T 細胞における 3×28 (Xcellerate) ビーズ刺激。

【0207】

次いで、細胞サイズ (順方向散乱)、表面型、活性化マーカー発現およびサイトカイン分泌の動力学的な分析は、実施された。図 12 は、第 1 のおよび第 2 の刺激後の順方向散乱 (細胞サイズ) 動力学を示す。図 13 は、第 1 のおよび第 2 の刺激後の CD25 (IL-2 レセプター) 発現動力学を示す。図 16 は、CD4⁺ T 細胞 (A) および CD8⁺ T 細胞 (B) における、第 2 の刺激後の CD54 (ICAM) 発現を示し、ここで第 1 の刺

10

20

30

40

50

激は、PHAかまたはCD3×CD28ビーズかのいずれかであり、そして再刺激は、なし、PHAか、または3×28ビーズのいずれかであった。CD4陽性細胞とCD8陽性細胞間を示すマーカーをまた、3×28抗ビーズ活性化の間に相対的な比を決定するために使用した(図19および22)。

【0208】

(実施例XII)

(同時刺激T細胞のサイトカイン発現パターンの分析)

種々のサイトカイン(IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、およびIL-4を含む)の役割は、T細胞維持、発現および分化に関連するように、広範に研究されている。特にIL-2は、T細胞維持および発現の支持的であることがしめされている。IFN- γ は、T_H₁型免疫レスポンスへのT細胞の分化を駆動することが示唆されているが、IL-4は、T_H₂型応答に対するT細胞の駆動について示唆されている。PHAかまたはCD3×CD28かのいずれかによって活性化される第1のヒトT細胞におけるサイトカイン放出レベルを、実施例IX(第1の刺激に対する応答および第2の刺激に対する応答の動力学的研究を含む)のようにT細胞を刺激することによって分析した。このデータを、図18A-Cに示す、そして図23-24は、CD3×CD28ビーズ刺激の特有の性質を示す。2日目と4日目との間の最初の刺激後(1日目は、評価されなかった)、IL-2およびIFN- γ の両方の非常に高いレベルを観察した。絶対的なIL-2レベルの約5倍の増大を、PHAで刺激されたT細胞で観察されたレベルと比較して3×28ビーズ刺激されたT細胞について示した。IFN- γ レベルの約7倍に増大をまた、PHA対応物と比較して3×28刺激したT細胞において観察した。IL-4の場合、増大は、第1の刺激に対して劇的ではなかった。興味深いことに、おそらく大きな有意さは、第1の刺激後に細胞が、静止状態(上記される3つのサイトカインをもはや分解しないかまたは分泌しない)になった後に、これらが、CD3×CD28ビーズ、PHAまたは未刺激のままかのいずれかで刺激されたことである。CD3×CD28ビーズを介して最初の活性化/発現シグナルを受け取るT細胞は、第1の刺激後に観察されるよりもさらに高いレベルのIFN- γ を分泌する。反対に、PHAで最初に刺激された細胞は、3×28対応物に見られるよりもより低いレベルのIFN- γ を分泌した。類似の差異をまた、IL-4レベルで観察した。

【0209】

これらのデータは、CD3×CD28ビーズを介して媒介された以下の活性化/発現を得た細胞が、例えば、PHAのような、拡張の他の手段から得られた細胞よりも機能的に異なる。この得られた細胞は、T_H₁型プロファイル(IFN- γ)を支持する可能性がある、T_H₁サイトカインおよびT_H₂サイトカインの非常に高いレベルを促進する、改変されたサイトカイン分泌応答を有することが明らかである。培養物におけるこれらサイトカインのこのような高いレベルの分泌は、多くの効果(抗腫瘍応答および抗ウイルス応答を支持する、T_H₁分化経路にT細胞を駆動すること;および得られたT細胞に基礎的な機能性を改変すること(例えば、活性の閾値を下げることもおよびプログラムされた細胞死経路を阻害すること)によってまたことを含む)を有し得る。

【0210】

(実施例XIII)

(同時刺激されたT細胞のCD54発現の分析)

図16は、CD14⁺T細胞(A)およびCD8⁺T細胞(B)において、第2の刺激後のCD54(ICAM)発現を示す場合、第1の刺激が、PHAかまたはCD3×CD28ビーズかのいずれかであり、そして細胞刺激が、なしかまたはPHA、または3×28ビーズであった。

【0211】

(実施例XIV)

(短期間活性化マーカーアッセイ)

マーカー発現を、実施例IXに記載されるT細胞の刺激後の種々の時間にわたってモニタ

一した。この点に関して、細胞を、抗ヒトCD4 (Immunotech Fullerton, CA)、FITC-結合化抗ヒトCD11a (Pharmingen)、FITC結合化抗ヒトCD26 (Pharmingen)、FITC-結合化抗ヒトCD49d (Coulter)、FITC-結合化抗ヒトCD54 (PharmingenおよびBecton Dickinson)、FITC-結合化抗ヒトCD95 (Pharmingen)、FITC-結合化抗ヒトCD134 (Pharmingen)、FITC-結合化抗ヒトCD25Ab (Becton Dickinson Fullerton, CA)、FITC-結合化抗ヒトCD64Ab (Becton Dickinson)、FITC-またはPE-結合化抗ヒトCD154Ab (Becton Dickinson)、またはFITCまたはPE-結合化IgG1アイソタイプコントロールAbで標識化した細胞 (2×10^5) を、 $30 \mu\text{l}$ の終濃度中の各濃度の $2 \mu\text{l}$ で 4°C において20分間標識し、洗浄しそして1%のパラホルムアルデヒド (Sigma, St. Louis, MO) 中で再懸濁した。図21-22および26A-26Lを参照のこと、これらの図によって実施されたように、 $\text{CD}4^+$ 細胞と $\text{CD}8^+$ 細胞との間と同様に活性化時間にわたって有意な差異が見られる。

【0212】

前述から、本発明の特定の実施形態は、例示の目的で本明細書中に記載されるが、種々の改変は、本発明の精神および範囲を逸脱することなく行なわれ得ることが理解される。従って、本発明は、添付の請求項の範囲を除いて限定されない。全ての参照、特許、特許出願など（上に引用される）は、全体が本明細書中に援用される。さらに、本明細書に引用される全ての数値的な範囲は、範囲内の全ての整数値を明白に含む。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、磁性濃縮および刺激した約 0.5×10^9 T細胞 (XCELLERATE $\text{I I}^{\text{T M}}$) または磁性濃縮および刺激していない約 0.5×10^9 T細胞 (XCELLERATE $\text{I}^{\text{T M}}$) で開始し、8日目に測定した活性化され、かつ拡張されたT細胞の総数を比較したプロットである。

【図2】

図2は、8日目に測定した磁性濃縮および刺激した (XCELLERATE $\text{I I}^{\text{T M}}$) または磁性濃縮および刺激していない (XCELLERATE $\text{I}^{\text{T M}}$)、活性化され、かつ拡張されたT細胞の拡大倍を比較したプロットである。

【図3】

図3は、磁性濃縮および刺激した後に8日間培養する前のT細胞 (XCELLERATE $\text{I I}^{\text{T M}}$) または磁性濃縮および刺激していないT細胞 (XCELLERATE $\text{I}^{\text{T M}}$) の再刺激を比較したCD154発現のフローサイトメーター分析を示すプロットである。

【図4】

図4は、磁性濃縮および刺激した (XCELLERATE $\text{I I}^{\text{T M}}$) と磁性濃縮および刺激せずに活性化された細胞 (XCELLERATE $\text{I}^{\text{T M}}$) を比較した培養3日目のCD154発現のフローサイトメーター分析を示すプロットである。

【図5】

図5A~5Bは、XCELLERATE $\text{I}^{\text{T M}}$ 処理を開始するためにPBMC (5A) または凍結されそして解凍されたPBMC (5B) を加えるXCELLERATE $\text{I}^{\text{T M}}$ でのT細胞活性化および拡張を描いたプロットである。

【図6】

図6A~6Bは、XCELLERATE $\text{I}^{\text{T M}}$ またはXCELLERATE $\text{I I}^{\text{T M}}$ 処理の間の1つのドナーサンプル (PC071) におけるT細胞の活性化後のCD25発現の時間推移分析を描いたプロットである。再刺激は、インビボでの活性化を刺激するために8日目のマークで実施された。図6Aは、 $\text{CD}4^+$ 細胞上のCD25発現を描き、一方、図6Bは、 $\text{CD}8^+$ 細胞上のCD25発現を描く。

【図 7】

図 7 A ~ B は、X C E L L E R A T E I^TM または X C E L L E R A T E I I^TM 処理の間の 1 つのドナーサンプル (P C 0 7 1) における T 細胞の活性化後の C D 1 5 4 発現の時間推移分析を描いたプロットである。再刺激は、インビボでの活性化を刺激するために 8 日目のマークで実施された。図 7 A は、C D 4⁺ 細胞上の C D 1 5 4 発現を描き、一方、図 6 B は、C D 8⁺ 細胞上の C D 1 5 4 発現を描く。

【図 8】

図 8 A および 8 B は、実施例 I X に示される抗 C D 3 および抗 C D 2 8 同時固定化ビーズを利用する処理を用いた刺激後のヒト末梢血 T 細胞の増殖を示すプロットである。

【図 9】

図 9 は、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 同時固定化ビーズを用いた、1 0 u / m l の組換えヒト I L - 2 有 / 無 (+ / -) および単球除去 有 / 無での刺激後のヒト末梢血 T 細胞の増殖を示すプロットである。全ての細胞は、B a x t e r L i f e c e l l F l a s k s (3 0 0 m l) で培養された。スケールアップとは、B a x t e r L i f e c e l l 1 3 L フラスコまで拡張される 3 0 0 m l フラスコ培養 (I L - 2 無し / 単球除去) をいう。

【図 1 0】

図 1 0 は、経時的な前方散乱フローサイトメトリープロファイルによって決定されるような細胞サイズの動力学分析を示すプロットである。

【図 1 1】

図 1 1 A および 1 1 B は、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 同時固定化ビーズを用いた初回刺激後の経時的な C D 2 5 発現を示すプロットである。図 1 1 A は、C D 4⁺ 細胞上の C D 2 5 の発現プロファイルを示し、一方、図 1 1 B は、C D 8⁺ 細胞上の C D 2 5 の発現プロファイルを示す。

【図 1 2】

図 1 2 は、一次刺激および二次刺激後の経時的な前方散乱フローサイトメトリープロファイルによって決定されるような細胞サイズにおける変化を示すプロットである。

【図 1 3 A】

図 1 3 A は、一次刺激および二次刺激後の経時的な C D 2 5 発現を示すプロットである。

図 1 3 A は、C D 4⁺ 細胞上の C D 2 5 の発現プロファイルを示す。

【図 1 3 B】

図 1 3 B は、一次刺激および二次刺激後の経時的な C D 2 5 発現を示すプロットである。

図 1 3 B は、C D 8⁺ 細胞上の C D 2 5 の発現プロファイルを示す。

【図 1 4】

図 1 4 A および 1 4 B は、二次刺激後の C D 1 5 4 発現を示すフローサイトメトリーデータプロットであり、ここで、一次刺激供給源および二次刺激供給源は変更された。図 1 4 A は、C D 4⁺ 細胞上の C D 1 5 4 の発現プロファイルを示し、一方、図 1 4 B は、C D 8⁺ 細胞上の C D 1 5 4 の発現プロファイルを示す。

【図 1 5】

図 1 5 は、二次刺激後のサンプル中の全ての拡張された T 細胞上の C D 1 3 7 発現を示すフローサイトメトリープロットである。

【図 1 6】

図 1 6 A および 1 6 B は、二次刺激後の C D 5 4 発現を示すフローサイトメトリーデータプロットであり、ここで、一次刺激供給源および二次刺激供給源は変更された。図 1 6 A は、C D 4⁺ 細胞上の C D 5 4 の発現プロファイルを示し、一方、図 1 6 B は、C D 8⁺ 細胞上の C D 5 4 の発現プロファイルを示す。

【図 1 7】

図 1 7 A ~ 1 7 D は、B 細胞慢性リンパ性白血病を有する親から得られた T 細胞の抗 C D 3 および抗 C D 2 8 結合ビーズによる二次刺激後の細胞表現型ならびに C D 1 5 4 および C D 1 3 7 発現を示すフローサイトメトリーデータプロットである。図 1 7 A および 1 7

10

20

30

40

50

Bは、抗CD3および抗CD28結合ビーズを用いる一次刺激後13日目のサンプル中に存在するCD4⁺細胞およびCD8⁺細胞(17A)ならびに抗CD3および抗CD28結合ビーズを用いる一次刺激後18日目および二次刺激後7日目のサンプル中に存在するCD4⁺細胞およびCD8⁺細胞(17B)を示す。図17Cおよび17Dは、B細胞慢性リンパ性白血病を有する親から得られた細胞の二次刺激後のCD154発現およびCD137発現を示すフローサイトメトリーデータプロットである。

【図18A】

図18Aは、正常なドナー由来のT細胞の一次刺激および二次刺激後のIL-2の経時的な発現を示すプロットである。

【図18B】

図18Bは、正常なドナー由来のT細胞の一次刺激および二次刺激後のインターフェロンγ(IFN-γ)の経時的な発現を示すプロットである。

【図18C】

図18Cは、正常なドナー由来のT細胞の一次刺激および二次刺激後のIL-4の経時的な発現を示すプロットである。

【図19A】

図19Aは、抗CD3および抗CD28結合ビーズでの刺激後のCD62Lの経時的な発現を示すプロットである。

【図19B】

図19Bは、抗CD3および抗CD28結合ビーズでの刺激後のCD62Lの経時的な発現を示すプロットである。

【図20】

図20は、抗CD3および抗CD28同時固定化ビーズでの刺激後のCD4細胞またはCD8細胞のパーセンテージを描くプロットである。

【図21】

図21A~21Bは、実施例IXにおける抗CD3および抗CD28同時固定化ビーズならびに刺激の有/無しを利用する処理を用いた刺激後のCD25発現およびCD154発現平均蛍光強度の関数として、それぞれ、フローサイトメトリーデータを示すプロットである。

【図22】

図22A~22Bは、抗CD3および抗CD28同時固定化ビーズ刺激の前の、CD4亜集団およびCD8亜集団の両方(22A)またはCD4富化集団(22B)を有する細胞におけるCD154染色対コントロール染色(例えば、バックグランド)のフローサイトメトリー分析を示すプロットである。

【図23】

図23A~23Bは、抗CD3および抗CD28同時固定化ビーズを用いる末梢血リンパ球の刺激後の培地中のTNF-(23A)およびIFN-(23B)のELISA分析を示すプロットである。

【図24】

図24A~24Bは、抗CD3および抗CD28同時固定化ビーズを用いる末梢血リンパ球の刺激後の培地中のIL-4(24A)およびIL-2(24B)のELISA分析を示すプロットである。

【図25】

図25は、抗CD3および抗CD28同時固定化ビーズを用いる末梢血リンパ球の刺激後に、前方散乱分析を使用したT細胞サイズにおける増加を描くプロットである。

【図26A】

図26Aは、抗CD3および抗CD28同時固定化ビーズを用いる刺激ならびに8日目に同じものを用いる再刺激後のCD62L発現(平均蛍光強度、MFI)(26A)のフローサイトメトリーデータを示す棒グラフである。

【図26B】

図 2 6 B は、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 同時固定化ビーズを用いる刺激ならびに 8 日目に同じものを用いる再刺激後の C D 4 9 d (M F I) 発現のフローサイトメトリーデータを示す棒グラフである。

【図 2 6 C】

図 2 6 C は、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 同時固定化ビーズを用いる刺激ならびに 8 日目に同じものを用いる再刺激後の C D 2 5 (M F I) (2 6 C) 発現のフローサイトメトリーデータを示す棒グラフである。

【図 2 6 D】

図 2 6 D は、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 同時固定化ビーズを用いる刺激ならびに 8 日目に同じものを用いる再刺激後の C D 6 9 (M F I) 発現のフローサイトメトリーデータを示す棒グラフである。

10

【図 2 6 E】

図 2 6 E は、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 同時固定化ビーズを用いる刺激ならびに 8 日目に同じものを用いる再刺激後の C D 1 5 4 (M F I) 発現のフローサイトメトリーデータを示す棒グラフである。

【図 2 6 F】

図 2 6 F は、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 同時固定化ビーズを用いる刺激ならびに 8 日目に同じものを用いる再刺激後の前方光散乱 (サイズ) 発現のフローサイトメトリーデータを示す棒グラフである。

【図 2 6 G】

図 2 6 G は、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 同時固定化ビーズを用いる刺激ならびに 8 日目に同じものを用いる再刺激後の生存力 (% 生存ゲート) 発現のフローサイトメトリーデータを示す棒グラフである。

20

【図 2 6 H】

図 2 6 H は、刺激後の 4 時間目ならびに 1 8 時間目での C D 6 2 L を描く。

【図 2 6 I】

図 2 6 I は、刺激後の 4 時間目ならびに 1 8 時間目での C D 6 9 を描く。

【図 2 6 J】

図 2 6 J は、刺激後の 4 時間目ならびに 1 8 時間目での C D 4 9 d を描く。

【図 2 6 K】

図 2 6 K は、刺激後の 4 時間目ならびに 1 8 時間目での C D 1 5 4 を描く。

30

【図 2 6 L】

図 2 6 L は、それぞれ、刺激後の 4 時間目ならびに 1 8 時間目での C D 2 5 を描く。

【図 1】

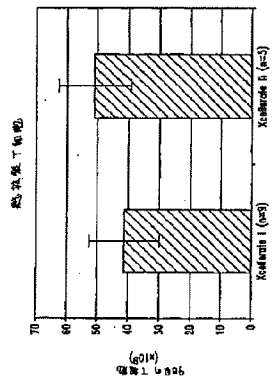


Fig. 1

【図 2】

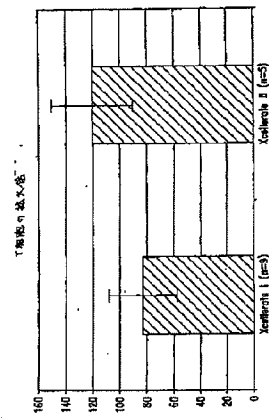


Fig. 2

【図 3】

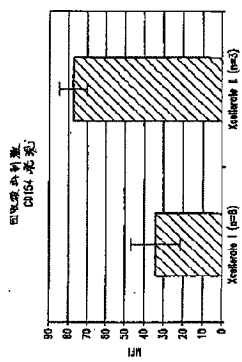


Fig. 3

【図 4】

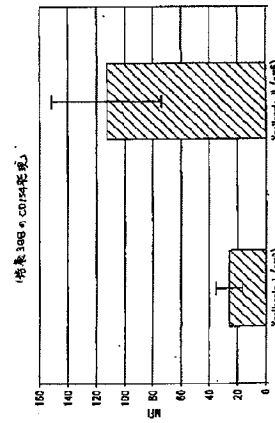
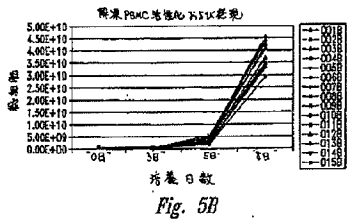
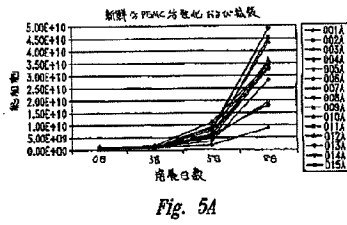
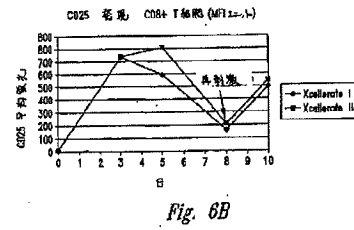
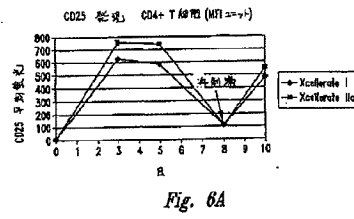


Fig. 4

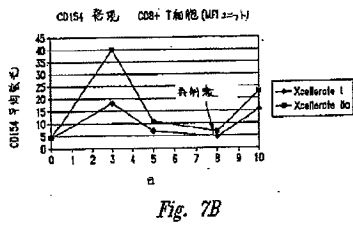
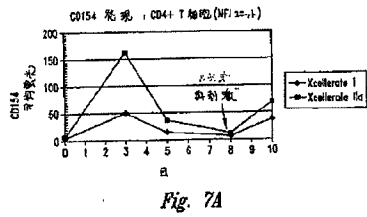
【図 5】



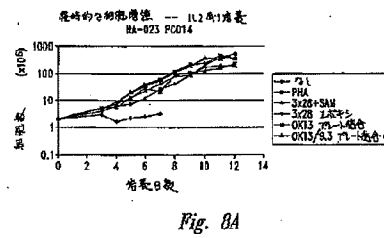
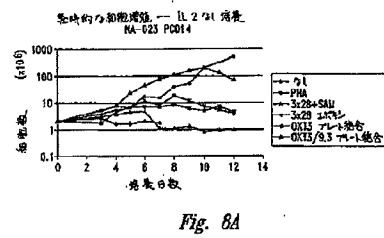
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【図 9】

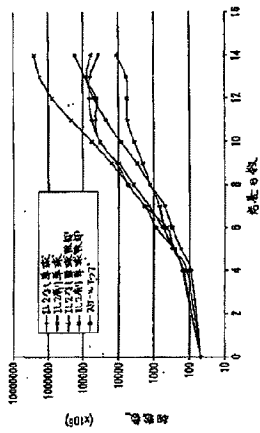


Fig. 9

【図 10】

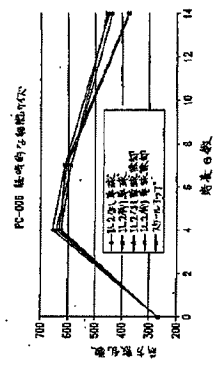


Fig. 10

【図 11】

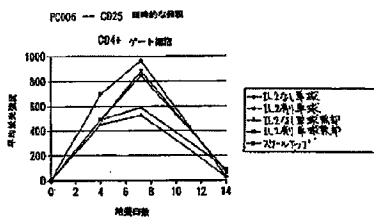


Fig. 11A

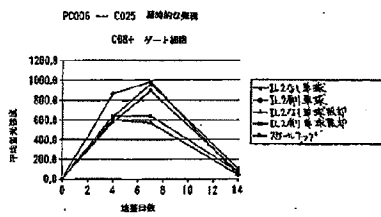


Fig. 11B

【図 12】

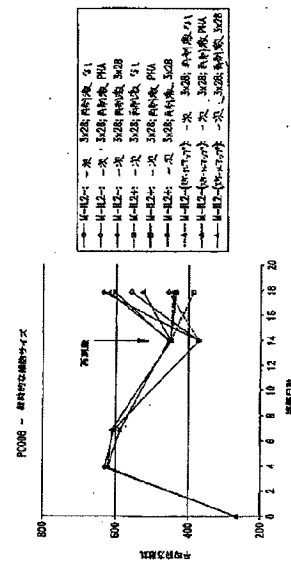


Fig. 12

【图 13 B】



【图 16】



【図 19 A】

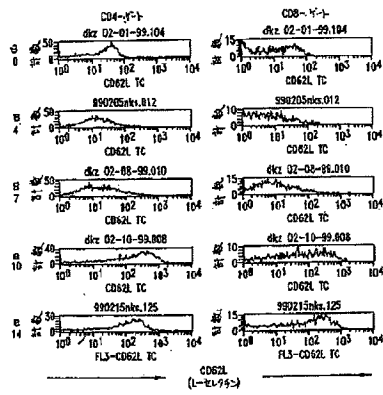


Fig. 19A

【図 19 B】

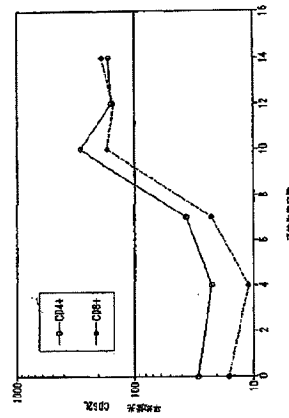


Fig. 19B

【図 20】

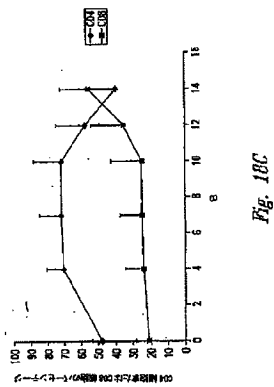


Fig. 19C

【図 21】

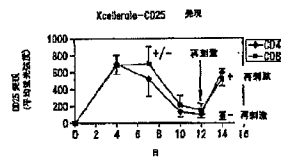


Fig. 21A

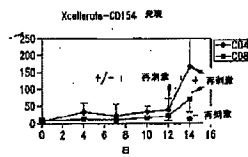


Fig. 21B

【図 2 2】

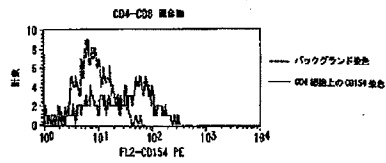


Fig. 22A

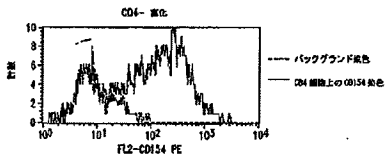


Fig. 22B

【図 2 3】

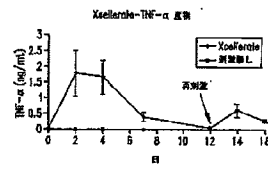


Fig. 23A

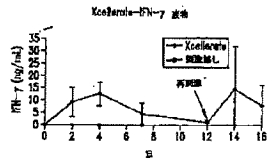


Fig. 23B

【図 2 4】

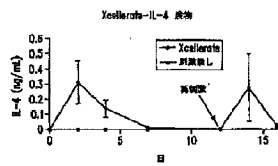


Fig. 24A

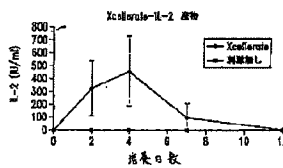


Fig. 24B

【図 2 5】

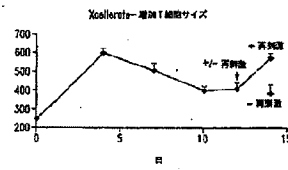


Fig. 25

【図 2 6 A】

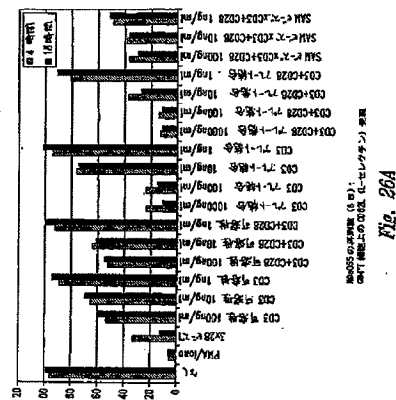


Fig. 26A

【图 26 C】

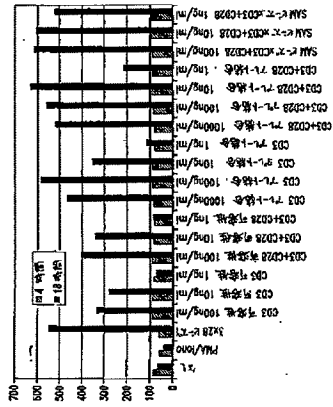


Fig. 28C

【图 2 6 E】

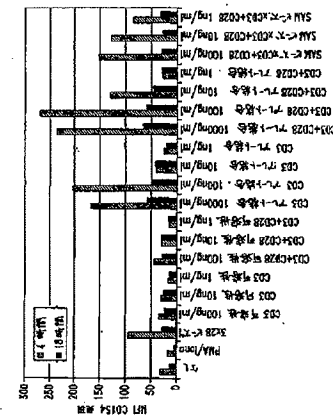
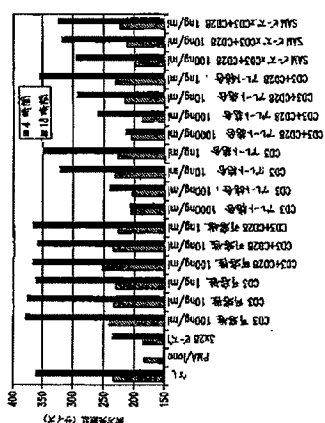


Fig. 26E

【图 26 F】



4685の系列車 (8日):
方元車区 (サイズ)

【图 26 G】

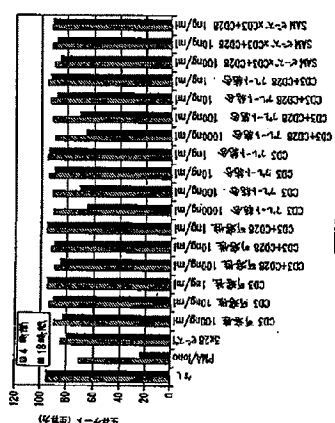


Fig. 26G

【図 26 H】

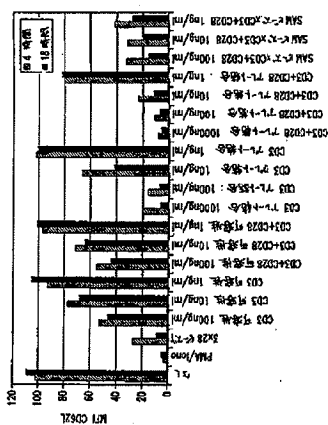


Fig. 26H

【图 2 6 I】

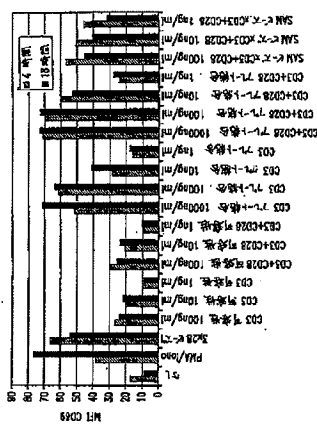


Fig. 261

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 August 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/62895 A2(51) International Patent Classification: C12N 5/00,
A61K 16/00, A61K 31/00, C08F 10/00, C08F
10/00, 25/00, 25/01, 31/01, 75/00, C07K 14/00, 16/00,
B03C 1/00, A61K 9/70

(11) International Application Number: PCT/US01/06139

(12) International Filing Date: 26 February 2001 (26.02.2001)

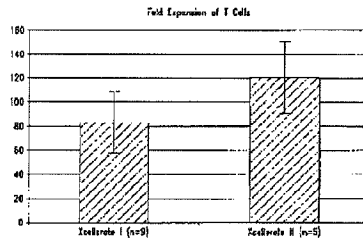
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00/151,788 24 February 2000 (24.02.2000) US
60/240,902 17 November 2000 (17.11.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): SCYTE
THERAPEUTICS, INC., (US/US); Suite 130, 1124 Columbia
Street, Seattle, WA 98104 (US).(72) Inventors and
(73) Inventors/Applicants (for US only): BERENSON, Ron(US/US), P.O. Box 1598, Mercer Island, WA 98040 (US);
LAW, Che (FR/US); 18834 Phinney Avenue N, Shoreline,
WA 98133 (US); BONYHADI, Mark (US/US); 27187
SE 27th Street, Issaquah, WA 98029 (US); SAUND,
Nathaniel HUNTER; 914 NW 122nd Street, Seattle, WA
98177 (US); CRAIG, Stewart (FR/US); 1791 267th
Court SE, Issaquah, WA 98029 (US); KALAMASZ, Dale
(US/US); 12045 184th Avenue NE, Redmond, WA 98052
(US); HARDWICK, Alan (US/US); 6312 Atlas Place SW,
Seattle, WA 98136 (US); MCNEIL, J.N., David (US/US);
Metropolitan Park, 601 South Washington Street, #412,
Seattle, WA 98101 (US).(74) Agents: CHRISTIANSEN, William, T., et al.; Scott In-
ternational Property Law Group PLLC, Suite 6300, 701 Fifth
Avenue, Seattle, WA 98101 7092 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
NI, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PK, PL, PT, RO, RU, SE,
SI, SK, SL, SR, ST, SV, SZ, TD, TH, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

/Continued on next page/

(54) Title: SIMULTANEOUS STIMULATION AND CONCENTRATION OF CELLS



(57) Abstract: The present invention relates generally to methods for stimulating cells, and more particularly, to a novel method to concentrate and stimulate cells that maximizes stimulation and/or proliferation of such cells. In the various embodiments, cells are stimulated and concentrated with a surface yielding enhanced proliferation, cell signal transduction, and/or cell surface moiety aggregation. In certain aspects, methods for stimulating a population of cells such as T-cells, by simultaneous concentration and cell surface moiety ligation are provided by connecting the population of cells with a surface, that has attached thereto one or more agents that ligate a cell surface moiety and applying a force that predominantly drives cell concentration and cell surface moiety ligation, thereby inducing cell stimulation, cell surface moiety aggregation, and/or receptor signaling enhancement. Also provided are methods for producing phenotypically altered cells, including T-cells for the use in diagnostics, drug discovery, and the treatment of a variety of indications, including cancer, viral infections, and immune related disorders. Compositions of cells having specific phenotypic properties produced by these processes are further provided.

WO 01/62895 A2

WO 01/62895 A2



(54) Designated States (regional): ARIPO patents (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UA, UB), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patents (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/61895

PCT/US81/06139

1

SIMULTANEOUS STIMULATION AND CONCENTRATION OF CELLS

TECHNICAL FIELD

The present invention relates generally to methods for stimulating cells, and more particularly, to methods to concentrate and stimulate cells that maximizes stimulation of such cells. The present invention also relates to compositions of cells, including stimulated T-cells having specific phenotypic characteristics.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Many cells are activated or regulated via receptors embedded in lipid rafts found in cell surface membranes. See K. Simons and D. Toomre, *Nature Rev.* 1:31, 2000. Lipid rafts form concentrating platforms for individual receptors that are activated by ligand binding. Lipid rafts are involved in cellular signaling processes, including immunoglobulin E signaling during the allergic immune response, glial-cell-derived neurotrophic factor signaling important for the development and maintenance of the nervous system, *Ras* signaling, central to many signal transduction processes, and T-cell antigen receptor (TCR) signaling.

The T-cell antigen receptor (TCR) is a multisubunit immune recognition receptor that associates with the CD3 complex and binds to peptides presented by the major histocompatibility complex (MHC) class I and II proteins on the surface of antigen-presenting cells (APCs). Binding of TCR to the antigenic peptide on the APC is the central event in T-cell activation, which occurs at an immunological synapse at the point of contact between the T-cell and the APC. Moreover, data suggest that clustering of lipid rafts is essential to the formation of the immunological synapse. Krawczyk *et al.*, *Immunity* 13(4):463-73, 2000.

To sustain T-cell activation, T lymphocytes typically require a second co-stimulatory signal. Co-stimulation is typically necessary for a T helper cell to produce sufficient cytokine levels that induce clonal expansion. Bretscher, *Immunol. Today* 13:74, 1992; June *et al.*, *Immunol. Today* 15:321, 1994. The major co-

WO 01/62895

PCT/US01/06139

2

stimulatory signal occurs when a member of the B7 family ligands (CD80 (B7.1) or CD86 (B7.2)) on an activated antigen-presenting cell (APC) binds to CD28 on a T-cell.

Methods of stimulating the expansion of certain subsets of T-cells have the potential to generate a variety of T-cell compositions useful in immunotherapy.

- 5 Successful immunotherapy can be aided by increasing the reactivity and quantity of T-cells by efficient stimulation.

The various techniques available for expanding human T-cells have relied primarily on the use of accessory cells and/or exogenous growth factors, such as interleukin-2 (IL-2). IL-2 has been used together with an anti-CD3 antibody to stimulate T-cell proliferation, predominantly expanding the CD8⁺ subpopulation of T-cells. Both APC signals are thought to be required for optimal T-cell activation, expansion, and long-term survival of the T-cells upon re-infusion. The requirement for MHC-matched APCs as accessory cells presents a significant problem for long-term culture systems because APCs are relatively short-lived. Therefore, in a long-term culture system, APCs must be continually obtained from a source and replenished. The necessity for a renewable supply of accessory cells is problematic for treatment of immunodeficiencies in which accessory cells are affected. In addition, when treating viral infection, if accessory cells carry the virus, the cells may contaminate the entire T-cell population during long-term culture.

- 20 In the absence of exogenous growth factors or accessory cells, a co-stimulatory signal may be delivered to a T-cell population, for example, by exposing the cells to a CD3 ligand and a CD28 ligand attached to a solid phase surface, such as a bead. See C. June, *et al.* (U.S. Patent No. 5,858,358); C. June *et al.* WO 99/953823. While these methods are capable of achieving therapeutically useful T-cell populations, increased robustness and ease of T-cell preparation remain less than ideal.

- 25 In addition, the methods currently available in the art have not focused on short-term expansion of T-cells or obtaining a more robust population of T-cells and the beneficial results thereof and/or the expansion of particular T-cell subclasses/phenotypes. Furthermore, the applicability of expanded T-cells has been limited to only a few disease states. For maximum *in vivo* effectiveness, theoretically,

WO 01/62895

PCT/US01/06139

3

an *ex vivo*- or *in vivo*-generated, activated T-cell population should be in a state that can maximally orchestrate an immune response to cancer, infectious disease, or other disease states. The present invention provides methods to generate an increased number of more highly activated and more pure T-cells that have surface receptor and cytokine production characteristics that appear more healthy and natural than other expansion methods.

In addition, the present invention provides compositions of phenotypically tailored cell populations of any target cell, including T-cell populations and parameters for producing the same, as well as providing other related advantages.

10

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention generally provides methods for stimulating cells, and more particularly, provides a novel method to concentrate and stimulate cells that maximizes stimulation of such cells. In one aspect the present invention provides methods for stimulating a population of T-cells by simultaneous T-cell concentration and cell surface moiety ligation that comprises providing a population of cells wherein at least a portion thereof comprises T-cells, contacting the population of cells with a surface, wherein the surface has attached thereto one or more agents that ligate a cell surface moiety of at least a portion of the T-cells and stimulates at least that portion of T-cells or a subpopulation thereof and applying a force that predominantly drives T-cell concentration and T-cell surface moiety ligation, thereby inducing T-cell stimulation.

In one embodiment of the methods the surface has attached thereto a first agent that ligates a first cell surface moiety of a T-cell; and the same or a second surface has attached thereto a second agent that ligates a second moiety of said T-cell, wherein said ligation by the first and second agent induces proliferation of said T-cell. In related embodiments the surface may be biocompatible, natural or synthetic, comprise a polymer, comprise collagen, purified proteins, purified peptides, polysaccharides, glycosaminoglycans, or extracellular matrix compositions. In certain embodiments, the polysaccharides are selected from chitosan, alginate, dextran, hyaluronic acid, and

WO 01/61895

PCT/US98/06139

4

cellulose and the polymer is selected from polystyrene, polyesters, polyethers, polyanhydrides, polyalkyleneacrylates, polyacrylamides, polyorthoesters, polyphosphazenes, polyvinylacetates, block copolymers, polypropylene, polytetrafluoroethylene (PTFE), or polyurethanes. In yet other embodiments, the
 5 polymer may comprise lactic acid or a copolymer. While in still yet other embodiments, the polymer may be a copolymer. Such copolymers can be a variety of known copolymers and may include lactic acid and/or glycolic acid (PLGA).

With respect to biocompatible surfaces, such surfaces may be biodegradable or non-biodegradable. In related embodiments, while not limited thereto,
 10 the non-biodegradable surfaces may comprise poly(dimethylsiloxane) and/or poly(ethylene-vinyl acetate). Further, the biocompatible surface, while not limited thereto, may include collagen, metal, hydroxyapatite, glass, aluminate, bioceramic materials, hyaluronic acid polymers, alginate, acrylic ester polymer, lactic acid polymer, glycolic acid polymer, lactic acid/glycolic acid polymer, purified proteins,
 15 purified peptides, and/or extracellular matrix compositions.

In still yet further embodiments, the biocompatible surface is associated with an implantable device. The implantable device may be any that is desired to be used and may include a stent, a catheter, a fiber, a hollow fiber, a patch, or a suture. In related embodiments the surface may be glass, silica, silicon, collagen, hydroxyapatite,
 20 hydrogels, PTFE, polypropylene, polystyrene, nylon, or polyacrylamide. Yet additional embodiments include wherein the surface comprises a lipid, a plate, a bag, a rod, a pellet, a fiber, or a mesh. Other embodiments include wherein the surface is a particle and additionally wherein the particle comprises a bead, a microsphere, a nanoparticle, or a colloidal particle. Particle and bead sizes may also be chosen and may have a
 25 variety of sizes including wherein the bead is about 5 nanometers to about 500 microns in diameter.

In other embodiments, the agents used in the methods can be independently selected from a protein ligand, a natural ligand, or a synthetic ligand. Further, the agents may also comprise an antibody, an antibody fragment, a peptide, a
 30 polypeptide, a glycopeptide, a soluble receptor, a steroid, a hormone, a mitogen, an

W/O 01/61895

PCT/RUS81/06139

5

antigen, a superantigen, a growth factor, a cytokine, a lectin, a viral protein, an adhesion molecule, or a chemokine. In specific embodiments, at least one agent is an antibody or an antibody fragment. While in yet other embodiments, a first agent is an antibody and a fragment thereof, and a second agent is an antibody or a fragment thereof. It would of course be understood that the first and second agents could either be the same or different antibodies.

In selected embodiments the first agent is an anti-CD3 antibody, an anti-CD2 antibody, or an antibody fragment of an anti-CD3 or anti-CD2 antibody. Further selected embodiments include wherein the second agent is an anti-CD28 antibody or antibody fragment thereof. Further embodiments include wherein the second agent comprises a natural ligand for CD28, such as, e.g., B7-1 or B7-2. In addition, other stimulatory agents could be used.

In certain embodiments, the force used to drive the cells may include a variety of forces that function similarly, and include a force greater than gravitational force, a hydraulic force, a filtration force generated by transmembrane pressure, a centrifugal force, or a magnetic force. When magnetic forces are used, some embodiments utilize a magnetic force that is generated by a magnet having a magnetic field strength ranging from between about 200 gauss to about 12,000 gauss at the surface of the magnet.

Another embodiment includes surfaces wherein the surface is a surface of a paramagnetic particle. While in embodiments utilizing surfaces including a surface of a paramagnetic particle the agents attachment to the surface may be covalent, noncovalent, electrostatic, inter-molecular adhesion, or hydrophobic.

In still yet other embodiments the T-cells that are ligated are separated from the T-cells that are not ligated. While in other embodiments the T-cells ameliorate immune response dysfunction.

Other aspects that may be combined with the embodiments above include, for example methods for stimulation of T-cells by simultaneous cell surface moiety ligation and T-cell aggregation comprising providing a cell population comprising T-cells, contacting said cell population with a surface, wherein said surface

WO 01/62885

PCT/US01/06139

6

has attached thereto one or more ligands specific for a cell surface moiety, applying a force that drives concentration of T-cells and surface and incubating said cells for a period of time sufficient to achieve desired stimulation. In related embodiments the time sufficient to achieve desired stimulation may range from 1 minute to 10 days and
 5 all integer values, in between. In certain embodiments, the time range may be from about 1 day to about 8 days, while in yet other embodiments the time range may be from about 3 days to about 5 days, or from about 1 day to about 5 days. In related embodiments the incubation temperature may range from about 2 to about 38°C.

Further embodiments that can be used with all the recited methods
 10 include wherein the surface is selected from glass, silica, silicon, collagen, hydroxyapatite, hydrogels, PTFE, polypropylene, polystyrene, nylon, dextran, or polyacrylamide or mixtures of any of these. Further, embodiments include prior to or concurrently with any steps noted above, separating T-cells concentrated with surface from non-concentrated cells.

15 In other aspects methods of inducing T-cell activation *in vivo* are provided, comprising providing paramagnetic particles to an animal, said particles having attached thereto, ligands specific for a T-cell surface moiety that induces T-cell activation; applying a magnetic field to a discrete region of the animal, and thereby inducing localization and activation of T-cells bound to said particles at said discrete
 20 region.

An additional aspect is provided that includes methods for stimulating a population of target cells by simultaneous target cell concentration and target cell surface moiety ligation, comprising providing a population of cells wherein at least a portion thereof comprises target cells contacting said population of cells with a surface,
 25 wherein said surface has attached thereto one or more agents that ligate a cell surface moiety of at least a portion of said target cells and stimulates at least said portion of target cells, applying a force that predominantly drives target cell concentration and target cell surface moiety ligation, thereby inducing target cell stimulation.

In certain embodiments, the methods described herein utilize a surface
 30 that has attached thereto a first agent that ligates a first cell surface moiety of a target

WO 01/62895

PCT/US98/06139

7

cell; and the same or a second surface has attached thereto a second agent that ligates a second moiety of said target cell, wherein said ligation by the first and second agent induces signal transduction in said target cell.

As noted previously, the surface may include a variety of components including collagen, purified proteins, purified peptides, polysaccharides, glycosaminoglycans, and/or extracellular matrix compositions. Some polysaccharides that are utilized in specific embodiments may include chitosan, alginate, dextran, hyaluronic acid, and/or cellulose. Further, polymers as noted above and applicable to all methods may be selected from polyesters, polyethers, polyamides, polyalkylcyanoacrylates, polyacrylamides, polyorthoesters, polyphosphazenes, polyvinylacetates, block copolymers, polypropylene, polytetrafluoroethylene (PTFE), and/or polyurethanes and mixtures thereof.

In other aspects the methods are provided for stimulation of target cells by cell surface moiety ligation and target cell concentration, comprising providing a cell population comprising target cells, contacting said cell population with a surface, wherein said surface has attached thereto one or more ligands specific for a cell surface moiety, applying a force that drives concentration of target cells and concentration of said cells on said surface and incubating said cells for a period of time sufficient to achieve desired stimulation.

In related embodiments the target cells may be T-cells, B-cells, or stem cells.

Other aspects provide methods of inducing target cell stimulation *in vivo*, comprising providing paramagnetic particles to an animal, said particles having attached thereto, ligands specific for a target cell surface moiety that induces target cell stimulation; applying a magnetic field to a discrete region of the animal; and thereby inducing localization and stimulation of the target cells bound to said particles at said discrete region.

Still other aspects are provided which include methods for inducing receptor polarization in receptor bearing cells comprising providing a cell population, contacting said cell population with a solid surface, wherein said solid surface has

attached thereto one or more ligands specific for a cell surface receptor present on at least a portion of said cell population and applying a force that drives cell concentration and cell surface receptor ligation.

Other aspects include methods for inducing aggregation of cell surface molecules, comprising providing a population of cells having a target cell surface molecule, contacting said population of cells with a solid surface, wherein said solid surface has attached thereto a ligand for at least one target cell surface molecule, applying a force that drives aggregation of targeted cell surface molecules.

In certain embodiments the cell population comprises lymphocytes.

In yet other certain embodiments the receptor or cell surface moiety binding leads to down regulation or suppression of a cellular event. Related embodiments include wherein the receptor binding leads to up regulation or activation of a cellular event, which may include, for example, receptor mediated signal transduction.

Another embodiment of the invention envisions the use of a force to drive concentration or orientation of cell surface moieties.

Yet additional embodiments of the present invention provide phenotypically tailored target cell populations and/or compositions including T-cell compositions. In addition, methods are provided for activating such cells by ligating a cell surface moiety. Further provided are methods for inducing a population of T-cells to proliferate, comprising contacting the T-cells with a solid surface for a period of time of between about two hours and about nine days, the solid surface having immobilized thereon a first agent and second agent, and wherein the first agent provides an activation signal and the second agent provides a co-stimulatory signal to said T-cells.

These and other aspects of the present invention will become evident upon reference to the following detailed description and attached drawings.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

9

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a plot comparing the total numbers of activated and expanded T-cells measured at day 8 starting with about 0.5×10^5 T-cells with (XCELLERATE I™) or without (XCELLERATE I™) magnetic concentration and stimulation.

5 Figure 2 is a plot comparing fold expansion of activated and expanded T-cells measured at day 8 with (XCELLERATE I™) or without (XCELLERATE I™) magnetic concentration and stimulation.

Figure 3 is a plot representing flow cytometry analysis of CD154 expression comparing restimulation of T-cells previously cultured for 8 days after magnetic concentration and stimulation (XCELLERATE I™) or without magnetic concentration and stimulation (XCELLERATE I™).

10 Figure 4 is a plot representing flow cytometry analysis of CD154 expression following 3 days in culture comparing magnetic concentration and stimulation (XCELLERATE I™) with cells activated without magnetic concentration and stimulation (XCELLERATE I™).

15 Figures 5A-5B are plots depicting T-cell activation and expansion with XCELLERATE I™ PBMC (5A) or PBMC having been frozen and thawed (5B) to initiate the XCELLERATE I™ process.

Figures 6A-6B are plots depicting time course analysis of CD25 expression following activation of T-cells in one donor sample (PC071) during the XCELLERATE I or I™ process. Restimulation was performed at the 8 day mark to simulate *in vivo* activation. Figure 6A, depicts CD25 expression on CD4⁺ cells, while Figure 6B depicts CD25 expression on CD8⁺ cells.

20 Figures 7A-7B are plots depicting time course analysis of CD154 expression following activation of T-cells in one donor sample (PC071) during the XCELLERATE I or I™ process. Restimulation was performed at the 8 day mark to simulate *in vivo* activation. Figure 7A, depicts CD154 expression on CD4⁺ cells, while Figure 7B depicts CD154 expression on CD8⁺ cells.

25

WO 01/62895

PCT/US01/06139

10

Figures 8A and 8B are plots illustrating growth of human peripheral blood T-cells following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized beads utilizing process set forth in Example IX.

Figure 9 is a plot illustrating growth of human peripheral blood T-cells following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized beads +/- recombinant human IL-2 at 10 u/ml and +/- monocyte depletion. All cells were cultured in Baxter Lifecell Flasks (300ml). Scale up refers to a 300ml flask culture (No IL-2/Monocyte depleted) that was expanded up to a Baxter Lifecell 3 Liter flask.

Figure 10 is a plot demonstrating the kinetic analysis of cell size as determined by forward scatter flow cytometry profiles over time.

Figures 11A and 11B are plots representing CD25 expression over time following initial stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized beads. Figure 11A represents the expression profile of CD25 on CD4⁺ cells, while Figure 11B represents the expression profile of CD25 on CD8⁺ cells.

Figure 12 is a plot illustrates changes in cell size as determined by forward scatter flow cytometry profiles over time following primary and secondary stimulation.

Figures 13A and 13B are plots representing CD25 expression over time following primary and secondary stimulation. Figure 13A represents the expression profile of CD25 on CD4⁺ cells, while Figure 13B represents the expression profile of CD25 on CD8⁺ cells.

Figures 14A and 14B are flow cytometry data plots representing CD154 expression following secondary stimulation, wherein primary and secondary stimulation sources were varied. Figure 14A represents the expression profile of CD154 on CD4⁺ cells, while Figure 14B represents the expression profile of CD154 on CD8⁺ cells.

Figure 15 is a flow cytometry data plot representing CD137 expression on all expanded T-cells in sample following secondary stimulation.

Figures 16A and 16B are flow cytometry data plots representing CD34 expression following secondary stimulation, wherein secondary stimulation sources

WO 01/62895

PCT/US01/06139

11

were varied. Figure 16A represents the expression of CD54 on CD4⁺ cells, while Figure 16B represents the expression of CD54 on CD8⁺ cells.

Figures 17A-17D are flow cytometry data plots representing cell phenotypes as well as CD154 and CD137 expression following secondary stimulation by anti-CD3 and anti-CD28 coupled beads of T-cells obtained from a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Figures 17A and 17B represent CD4⁺ and CD8⁺ cells present in samples 13 days post-stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 coupled beads (17A) and 18 days post-primary stimulation and 7 days post-secondary stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 coupled beads (17B). Figures 17C and 17D are flow cytometry data plots representing CD154 and CD137 expression after secondary stimulation of cells obtained from a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Figures 18A-18C are plots representing the expression over time of IL-2 (18A), Interferon gamma (IFN- γ) (18B), and IL-4 (18C) following primary and secondary stimulation of T-cells from normal donors.

Figures 19A-19B are plots representing expression over time of CD62L following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 coupled beads.

Figure 20 is a plot depicting the percentage of CD4 or CD8 cells following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized beads.

Figures 21A-21B are plots representing flow cytometry data as a function of mean fluorescence intensity of CD25 and CD154 expression, respectively following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized beads and +/- re-stimulation utilizing process in Example IX.

Figures 22A-22B are plots representing flow cytometry analyses of CD154 staining versus control staining (e.g., background) in cells with both CD4 and CD8 sub-populations (22A) or CD4-enriched populations (22B), prior to anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized bead stimulation.

Figures 23A-23B are plots representing ELISA analysis of TNF- α (23A) and IFN- γ (23B) in media following stimulation of peripheral blood lymphocytes with anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized beads.

WO 01/62895

PCT/US91/06139

12

Figures 24A-24B are plots representing ELISA analysis of IL-4 (24A) and IL-2 (24B) in media following stimulation of peripheral blood lymphocytes with anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized beads.

Figure 25 is a plot depicting increase in T-cell size following stimulation of peripheral blood lymphocytes with anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized beads and using forward scatter analysis.

Figures 26A-26L are bar graphs representing flow cytometry data of CD62L expression (mean fluorescence intensity, MFI) (26A), CD49d (MFI) (26B), CD25 (MFI) (26C), CD69 (MFI) (26D), CD154 (MFI) (26E), forward light scatter (size) (26F), viability (% live gate) (26G); all following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized beads and re-stimulation with the same at day 8. Figures 26H-26L depict CD62L, CD69, CD49d, CD154, and CD25 at 4 and 18 hours post-stimulation, respectively.

15 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Prior to setting forth the invention, it may be helpful to an understanding thereof to set forth definitions of certain terms that will be used hereinafter.

The term "biocompatible", as used herein, refers to the property of being predominantly non-toxic to living cells.

20 The term "stimulation", as used herein, refers to a primary response induced by ligation of a cell surface moiety. For example, in the context of receptors, such stimulation entails the ligation of a receptor and a subsequent signal transduction event. With respect to stimulation of a T-cell, such stimulation refers to the ligation of a T-cell surface moiety that in one embodiment subsequently induces a signal transduction event, such as binding the TCR/CD3 complex. Further, the stimulation event may activate a cell and up or downregulate expression or secretion of a molecule, such as downregulation of TGF- β . Thus, ligation of cell surface moieties, even in the absence of a direct signal transduction event, may result in the reorganization of

cytoskeletal structures, or in the coalescing of cell surface moieties, each of which could serve to enhance, modify, or alter subsequent cell responses.

The term "activation", as used herein, refers to the state of a cell following sufficient cell surface moiety ligation to induce a noticeable morphological change. Within the context of T-cells, such activation, refers to the state of a T-cell that has been sufficiently stimulated to induce cellular proliferation. Activation of a T-cell may also induce cytokine production and performance of regulatory or cytolytic effector functions. Within the context of other cells, this term infers either up or down regulation of a particular physico-chemical process.

The term "force", as used herein, refers to an artificial or external force applied to the cells to be stimulated that induces cellular concentration and concentration of cells with the agent that binds a cell surface moiety. For example, the term "force" includes any force greater than gravity (*i.e.*, in addition to gravity and not solely gravitational force) that induces cell concentration and/or cell surface moiety ligation. Such forces include transmembrane pressure such as filtration, a hydraulic force, an electrical force, an acoustical force, a centrifugal force, or a magnetic force. Ideally, the force utilized drives the concentration of the target cell of interest with an agent that ligates a cell surface moiety. In various contexts, the force can be pulsed, *i.e.*, applied and reapplied (*e.g.*, a magnetic force could be turned off and on, pulsing the population of cells in combination with a paramagnetic particle).

The term "simultaneous", as used herein, refers to the fact that inherently upon concentrating cells at a surface that has cell surface moiety binding agents attached thereto, results in concentration of cells with each other and with the surface, thus ligands (*i.e.*, agents). However, the use of the term "simultaneous" does not preclude previous binding of the target cells with a surface having cell surface moiety binding agents attached thereto, as concentration and further ligand binding occurs simultaneously at the concentration surface. For example, within the context of T-cell activation, the T-cells may be exposed to a surface such as a paramagnetic bead having anti-CD3 and anti-CD28 antibodies attached thereto and subsequently concentrated by a

WIPO/01/62895

PCT/US81/06139

14

magnetic field. Thus, in this context while cells and beads have previous contact and ligation, nevertheless, during concentration of cells additional ligation occurs.

The term "target cell", as used herein, refers to any cell that is intended to be stimulated by cell surface moiety ligation.

5 An "antibody", as used herein, includes both polyclonal and monoclonal antibodies; primate (e.g., humanized); murine; mouse-human; mouse-primate; and chimeric; and may be an intact molecule, a fragment thereof (such as scFv, Fv, Fd, Fab, Fab' and F(ab')₂ fragments), or multimers or aggregates of intact molecules and/or fragments; and may occur in nature or be produced, e.g., by immunization, synthesis or
10 genetic engineering; an "antibody fragment," as used herein, refers to fragments, derived from or related to an antibody, which bind antigen and which in some embodiments may be derivatized to exhibit structural features that facilitate clearance and uptake, e.g., by the incorporation of galactose residues. This includes, e.g., F(ab), F(ab')₂, scFv, light chain variable region (V_L), heavy chain variable region (V_H), and
15 combinations thereof.

The term "protein", as used herein, includes proteins, polypeptides and peptides; and may be an intact molecule, a fragment thereof, or multimers or aggregates of intact molecules and/or fragments; and may occur in nature or be produced, e.g., by synthesis (including chemical and/or enzymatic) or genetic engineering.

20 The term "agent", "ligand", or "agent that binds a cell surface moiety", as used herein, refers to a molecule that binds to a defined population of cells. The agent may bind any cell surface moiety, such as a receptor, an antigenic determinant, or other binding site present on the target cell population. The agent may be a protein, peptide, antibody and antibody fragments thereof, fusion proteins, synthetic molecule,
25 an organic molecule (e.g., a small molecule), or the like. Within the specification and in the context of T-cell stimulation, antibodies are used as a prototypical example of such an agent.

The terms "agent that binds a cell surface moiety" and "cell surface moiety", as used herein, are used in the context of a ligand/anti-ligand pair.

30 Accordingly, these molecules should be viewed as a complementary/anti-

WI 01/62895

PCT/ISR1/06139

15

complementary set of molecules that demonstrate specific binding, generally of relatively high affinity.

A "co-stimulatory signal", as used herein, refers to a signal, which in combination with a primary signal, such as TCR/CD3 ligation, leads to T-cell proliferation.

A "ligand/anti-ligand pair", as used herein, refers to a complementary/anti-complementary set of molecules that demonstrate specific binding, generally of relatively high affinity. Exemplary ligand/anti-ligand pairs enzyme/inhibitor, hapten/antibody, lectin/carbohydrate, ligand/receptor, and biotin/avidin or streptavidin. Within the context of the present invention specification receptors and other cell surface moieties are anti-ligands, while agents (e.g., antibodies and antibody fragments) reactive therewith are considered ligands.

"Separation", as used herein, includes any means of substantially purifying one component from another (e.g., by filtration or magnetic attraction).

"Quiescent", as used herein, refers to a cell state wherein the cell is not actively proliferating.

A "surface", as used herein, refers to any surface capable of having an agent attached thereto and includes, without limitation, metals, glass, plastics, copolymers, colloids, lipids, cell surfaces, and the like. Essentially any surface that is capable of retaining an agent bound or attached thereto.

One aspect of the present invention is directed to the surprising finding that the combination of a force which induces the concentration of cells and ligation of cell surface moieties results in a profound enhancement in stimulation of these cells. In the prototypic example set forth herein, T-cells are utilized. However, one of skill in the art would readily conclude that the present invention has broad applicability to any cell type where cell surface moiety ligation or aggregation is desired or where such binding leads to a subsequent cellular signaling event (e.g., receptors). While not wishing to be bound by theory, the present invention may function by taking advantage of a phenomenon involving lipid rafting and/or receptor polarization. The phenomena are similar in that they suggest either initiation/enhancement of signal transduction by

the aggregation of lipid rafts comprising cell surface moieties or enhanced signal transduction due to localization (*i.e.*, polarization) of receptors at one, or even several area(s) of a cell. Thus, not only does such cell surface moiety ligation lead to unexpectedly robust cell activation and proliferation in T-cells but can also be applied to magnifying the signal transduction event of many cell types. Thus the present invention could be used in combination with an implantable device to induce a signal transduction event in a particular location in the body, used to *ex vivo* stimulate cells for subsequent infusion into a patient, and used to substantially enhance the study of signal transduction events in cells by amplifying signal transduction signals, thereby aiding in screening for drugs that affect such transduction events (*e.g.*, G-coupled protein receptors, related to schizophrenia, sleep, and other neurological indications; Tc fragment receptors on mast cells and basophils related to the allergic response). Accordingly, within the context of T-cells, the present invention provides a variety of unexpected advantages, first it eliminates the need for a separate monocyte-depletion step using "uncoated" particles, simplifies expansion of T-cells by requiring less cell transfers and less reagents, increased level of T-cell activation during activation process, reduces time and labor involved in the processing of the cells, reduces the cost of manufacturing, and increases the flexibility of scheduling patient processing and infusions.

In an additional aspect of the present invention, a first and second or more surfaces are utilized with or without ligands/agents bound thereto. In this embodiment, the various surfaces may have the same or different agents attached thereto for binding cell surface moieties of target cells. For example, a paramagnetic bead may have attached thereto an antibody for a receptor on a target cell and such beads may be mixed with a population of cells containing the target cell. Further, the cell population may be mixed with a second or more bead with the same or different cell surface moiety binding agents attached thereto. Upon force induced concentration, the beads and cells are brought together in a smaller volume and thus signaling is magnified. In another example, paramagnetic beads that have an agent specific for a carbohydrate or other non-receptor cell surface moiety attached thereto are mixed with

a population of cells containing the target cell. A magnetic field is then used to draw the bead attached cells to another surface that has receptor ligating agents attached thereto. Thus, the signal transduction inducing agent is on the second surface. In yet another example, an agent that binds a cell surface moiety of target cell may be attached to a particle large enough to be retained in a mesh or filter that itself may have ligands attached thereto.

As noted above, the present invention provides methods for stimulating a cell population by simultaneously concentrating and ligating moieties on the surfaces of the cells in that population. Contacting a cell population with an agent (e.g., a ligand) that binds to a cell surface moiety can stimulate the cell population. The ligand may be in solution but also may be attached to a surface. Ligation of cell surface moieties, such as a receptor, may generally induce a particular signaling pathway. Recent studies suggest that for signaling to occur, critical concentrations of lipid rafts containing the requisite receptors must aggregate. By way of example, raft aggregation may be facilitated *in vivo* or *in vitro* by attaching ligands for particular cell surface moieties to paramagnetic particles, exposing the ligand-bearing particles to the cells, and shortly thereafter or simultaneously applying a force, such as a magnetic field to assist polarizing the ligated moieties (e.g., receptors) and concentrating cells in a small volume. The application of a magnetic force concentrates the cells as well as concentrating the cells with the surface having agents attached thereto that ligate cell surface moieties, thereby bringing greater contact of the cells with the ligands, resulting in accelerated and more potent activation. Many applications of the present invention are possible, for example, if cells have low numbers of and/or dysfunctional receptors, the method may sufficiently concentrate such receptors in the lipid rafts to overcome such defects and to permit proper signaling activity. One example of such cell surface repertoire correction is in patients with certain types of leukemia, wherein prior to cell surface moiety stimulation with agents such as anti-CD3 and anti-CD28 antibodies several normal cell surface markers are unusually low, such as the CD3/TCR complex. By stimulating these cell populations with agents such as anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, the cell surface markers of these cells return to a level that appears normal

WO 01/62895

PCT/US81/06139

18

and as such can provide a more robust product for cancer therapy when returned to the patient. In yet other applications of this invention, cells may be efficiently concentrated and activated, including inducing receptor polarization, thereby maximizing receptor signaling events. Such applications have broad utility including the use in screening assays directed at receptors or by collecting cellular rafts on the surface of a cell to induce activation such as inducing apoptosis by ligating Fas or like molecules in a tumor cell.

In one example of such screening assays, one could use G-coupled protein receptor bearing cells and contact them with agents that bind thereto, these agents being bound to a surface that allows force induced concentration. Accordingly, as the receptors raft together the signal transduction event would be amplified. This could be important in the study of signal transduction events that are very low level in typical experiments and thus screening for drug compounds to inhibit or somehow modify such signal transduction events.

15 A. STIMULATION OF A CELL POPULATION

The methods of the present invention relates to the stimulation of a target cell by introducing a ligand or agent that binds to a cellular moiety, inducing a cellular event. Binding of the ligand or agent to the cell may trigger a signaling pathway that in turn activates particular phenotypic or biological changes in the cell. The activation of the cell may enhance normal cellular functions or initiate normal cell functions in an abnormal cell. The method described herein provides stimulation by forcing concentration of the cells together with the ligand or agent that ligates a cell surface moiety. Stimulation of a cell may be enhanced or a particular cellular event may be stimulated by introducing a second agent or ligand that ligates a second cell surface moiety. This method may be applied to any cell for which ligation of a cell surface moiety leads to a signaling event. The invention further provides means for selection or culturing the stimulated cells. The prototypic example described is stimulation of T-cells, but one of ordinary skill in the art will readily appreciate that the method may be applied to other cell types. By way of example, cell types that may be stimulated and

selected include fibroblasts, neuroblasts, hematopoietic stem cells and hematopoietic progenitor cells (CD34⁺ cells), mesenchymal stem cells, dendritic cells, cytolytic T-cells (CD8⁺ cells), other leukocyte populations, pluripotent stem cells, multi-potent stem cells, islet cells, etc. Accordingly, the present invention also provides populations
 5 of cells resulting from this methodology as well as cell populations having distinct phenotypical characteristics, including T-cells with specific phenotypic characteristics.

As noted above a variety of cell types may be utilized within the context of the present invention. For example, cell types such as B cells, T-cells, NK cells, other blood cells, neuronal cells, glandular (endocrine) cells, bone forming cells
 10 (osteoclasts, etc.), germ cells (e.g., oocytes), epithelial cells lining reproductive organs, and others may be utilized. Cell surface moiety-ligand pairs could include (but not exclusively): T-cell antigen receptor (TCR) and anti-CD3 mAb, TCR and major histocompatibility complex (MHC)†antigen, TCR and superantigens (e.g., staphylococcal enterotoxin B (SEB), toxic shock syndrome toxin (TSST), etc.), B cell
 15 antigen receptor (BCR) and anti-Ig, BCR and LPS, BCR and specific antigens (univalent or polyvalent), NK receptor and anti-NK receptor antibodies, FAS (CD95) receptor and FAS ligand, FAS receptor and anti-FAS antibodies, CD54 and anti-CD54 antibodies, CD2 and anti-CD2 antibodies, CD2 and LFA-3 (lymphocyte function related antigen-3), cytokine receptors and their respective cytokines, cytokine receptors
 20 and anti-cytokine receptor antibodies, TNF-R (tumor necrosis factor-receptor) family members and antibodies directed against them, TNF-R family members and their respective ligands, adhesion/rolling receptors and their ligands, adhesion/rolling receptors and antibodies against them, oocyte or fertilized oocyte receptors and their ligands, oocyte or fertilized oocyte receptors and antibodies against them, receptors on
 25 the endometrial lining of uterus and their ligands, hormone receptors and their respective hormone, hormone receptors and antibodies directed against them, and others.

The nature of the binding of a receptor by a ligand will either result in the multimerization of the receptors, or aggregation/orientation of the receptors, such
 30 that signaling or cell response is accelerated, improved, or otherwise altered so as to

confer a particular benefit, such as cell division, cytokine secretion, cell migration, increased cell-cell interaction, etc.

Two examples are given below that illustrate how such a multimerization, aggregation, or controlled reorientation of cell surface moieties could be of practical benefit.

In one example, normal T-cell activation by antigen and antigen presenting cells usually results in aggregation of TCR rafts, cytoskeletal reorganization, polarization of "activation" signals and cell division, for example. Using man-made approaches, such as those described herein, in the absence of "normal" *in-vivo* T-cell activation, one could accelerate, improve, or otherwise affect the functions described above, in particular through the accelerated, controlled, and spatially oriented ligation of TCR and CD28. Benefits could be improved cell expansion *in vitro* resulting in higher numbers of infusible and more robust cells for therapeutic applications. Other benefits could be improved receptor "aggregation" for cells with defects, such as lower-than-normal TCR density on the cell surface. Similarly, *in vivo* applications could be beneficial where specific T-cell populations need to be activated, such as tumor-specific T-cells at tumor sites. Improved receptor aggregation and orientation could provide an activation signal otherwise difficult to obtain for functionally tolerized T-cells. Further, such activation could be used within the context of antigen specific T-cells. In this regard T-cells from a tumor could be isolated and expanded and infused into the patient. Similarly, T-cells exposed to an antigen either *in vivo* or *in vitro* could be expanded by the present methodologies.

In another example, improved induction of cell death occurs via the FAS pathway: The ability to accelerate the multimerization of FAS, spatially orient "activated" FAS on target cell surfaces, or to promote a cumulative FAS ligation that would otherwise be unachievable, could provide significant benefit *in vivo*, particularly for treating cancer, autoimmune responses, or graft-versus-host disease. For example, a tumor cell may express low levels of FAS *in vivo*, and the host may express low levels of FAS-L at tumor sites (due to suppressive cytokines, etc.). Due to these low levels, an adequate FAS signal cannot be generated, allowing for tumor survival and growth. One

possible way to overcome this FAS/FAS-ligand deficiency could be to target tumors/tumor sites with monovalent or multivalent ligands for FAS (FAS-I, antibodies, etc.), bound to paramagnetic particles. Application of a strong magnetic field using the present at tumor sites (e.g., melanoma, Kaposi's sarcoma, squamous cell neck
 5 carcinomas, etc.) could provide for the spacial orientation of the paramagnetic particles at tumor sites as the particles bound FAS on tumor cells, adapted for receptor activation and/or T-cell activation and expansion. Increased FAS aggregation accompanied by signal polarization might provide adequate signal to now induce cell death in the tumor cells.

10 In one particular embodiment of the invention, a T-cell population may be stimulated by simultaneously concentrating and ligating the surfaces of the T-cells. In one aspect of the present invention, antibodies to CD3 and CD28 are co-immobilized on a surface. A preferred surface for such immobilization includes particles, and in certain aspects, beads, such as paramagnetic beads. In another aspect of the present
 15 invention, any ligand that binds the TCR/CD3 complex and initiates a primary stimulation signal may be utilized as a primary activation agent immobilized on the surface. Any ligand that binds CD28 and initiates the CD28 signal transduction pathway, thus causing co-stimulation of the cell with a CD3 ligand and enhancing activation of a population of T-cells, is a CD28 ligand and accordingly, is a co-
 20 stimulatory agent within the context of the present invention. In a further aspect of the invention, a force is applied to the mixture of T-cells and anti-CD3 and anti-CD28-coated surfaces to concentrate the T-cells, thus maximizing T-cell surface ligation. While in one particular embodiment the concentration force is magnetic force applied where the anti-CD3 and anti-CD28 coated surfaces are paramagnetic beads, other
 25 means to bring the cells and the ligands together in a concentrated fashion are available in the art. Such methods of stimulating a T-cell population provides significant bead-cell and/or cell-cell contact that induces surprisingly greater activation and/or proliferation of T-cells. Furthermore, the inventive methods alter the cell surface marker profile wherein the activated T-cells express cell surface markers that indicate a

WO 01/62895

PCT/US01/06139

22

more normal phenotype and less variable final product compared to the profile of the T-cells when first isolated from a subject with a disease.

1. The Primary Signal

The biochemical events responsible for *ex vivo* T-cell stimulation are set forth briefly below. Interaction between the TCR/CD3 complex and antigen presented in conjunction with either MHC class I or class II molecules on an antigen-presenting cell initiates a series of biochemical events termed antigen-specific T-cell activation. Accordingly, activation of T-cells can be accomplished by stimulating the T-cell TCR/CD3 complex or by stimulating the CD2 surface protein. An anti-CD3 monoclonal antibody can be used to activate a population of T-cells via the TCR/CD3 complex. A number of anti-human CD3 monoclonal antibodies are commercially available, exemplary are OKT3, prepared from hybridoma cells obtained from the American Type Culture Collection, and monoclonal antibody G19-4. Similarly, stimulatory forms of anti-CD2 antibodies are known and available. Stimulation through CD2 with anti-CD2 antibodies is typically accomplished using a combination of at least two different anti-CD2 antibodies. Stimulatory combinations of anti-CD2 antibodies that have been described include the following: the T11.3 antibody in combination with the T11.1 or T11.2 antibody (Meuer *et al.*, *Cell* 36:897-906, 1984), and the 9.6 antibody (which recognizes the same epitope as T11.1) in combination with the 9-1 antibody (Yang *et al.*, *J. Immunol.* 137:1097-1100, 1986). Other antibodies that bind to the same epitopes as any of the above described antibodies can also be used. Additional antibodies, or combinations of antibodies, can be prepared and identified by standard techniques.

A primary activation signal can also be delivered to a T-cell through other mechanisms. For example, a combination that may be used includes a protein kinase C (PKC) activator, such as a phorbol ester (e.g., phorbol myristate acetate), and a calcium ionophore (e.g., ionomycin, which raises cytoplasmic calcium concentrations), or the like. The use of such agents bypasses the TCR/CD3 complex but delivers a stimulatory signal to T-cells. Other agents acting as primary signals may include

WI 01/62895

PCT/US81/06139

23

natural and synthetic ligands. A natural ligand may include MHC with or without a peptide presented. Other ligands may include, but are not limited to, a peptide, polypeptide, growth factor, cytokine, chemokine, glycopeptide, soluble receptor, steroid, hormone, mitogen, such as PHA, or other superantigens. Within the context of
 5 the present invention, the use of concentration and stimulation may result in such high receptor polarization that no secondary signal is required to induce proliferation of T-cells.

In other embodiments, signal transduction events of any kind may be magnified or analyzed by utilizing the current invention. For example, G protein-coupled receptors may stimulated and measured using the concentration methods of the
 10 present invention.

2. *The Secondary Signal*

While stimulation of the TCR/CD3 complex or CD2 molecule appears to be required for delivery of a primary activation signal in a T-cell, a number of
 15 molecules on the surface of T-cells, termed accessory or co-stimulatory molecules, have been implicated in regulating the transition of a resting T-cell to blast transformation, and subsequent proliferation and differentiation. Thus, in addition to the primary activation signal, induction of T-cell responses requires a second, co-stimulatory signal. One such co-stimulatory or accessory molecule, CD28, is believed to initiate or regulate
 20 a signal transduction pathway that is distinct from any stimulated by the TCR complex.

Therefore, to enhance activation and proliferation of a population of T-cells in the absence of exogenous growth factors or accessory cells, an accessory molecule on the surface of the T-cell, such as CD28, is stimulated with a ligand that binds the accessory molecule. In one embodiment, stimulation of the accessory
 25 molecule CD28 and T-cell activation occur simultaneously by contacting a population of T-cells with a surface to which a ligand that binds CD3 and a ligand that binds CD28 are attached. Activation of the T-cells, for example, with an anti-CD3 antibody, and stimulation of the CD28 accessory molecule results in selective proliferation of CD4⁺ T-cells.

Accordingly, one of ordinary skill in the art will recognize that any agent, including an anti-CD28 antibody or fragment thereof capable of cross-linking the CD28 molecule, or a natural ligand for CD28 can be used to stimulate T-cells. Exemplary anti-CD28 antibodies or fragments thereof useful in the context of the present invention include monoclonal antibody 9.3 (IgG2_a) (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), monoclonal antibody KOL.T-2 (IgG1), 15F8 (IgG1), 248.23.2 (IgM), and EX5.3D10 (IgG2_a) (ATCC HB11373). Exemplary natural ligands include the B7 family of proteins, such as B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) (Freeman *et al.*, *J. Immunol.* 137:3260-3267, 1987; Freeman *et al.*, *J. Immunol.* 143:2714-2722, 1989; Freeman *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:625-631, 1991; Freeman *et al.*, *Science* 262:909-911, 1993; Azuma *et al.*, *Nature* 366:76-79, 1993; Freeman *et al.*, *J. Exp. Med.* 178:2185-2192, 1993). In addition, binding homologues of a natural ligand, whether native or synthesized by chemical or recombinant techniques, can also be used in accordance with the present invention. Other agents acting as secondary signals may include natural and synthetic ligands. Agents may include, but are not limited to, other antibodies or fragments thereof, a peptide, polypeptide, growth factor, cytokine, chemokine, glycopeptide, soluble receptor, steroid, hormone, mitogen, such as PHA, or other superantigens.

In a further embodiment of the invention, activation of a T-cell population may be enhanced by co-stimulation of other T-cell integral membrane proteins. For example, binding of the T-cell integrin LFA-1 to its natural ligand, ICAM-1, may enhance activation of cells. Another cell surface molecule that may act as a co-stimulator for T-cells is VCAM-1 (CD106) that binds very-late-antigen-4 (VLA-4) on T-cells.

One of skill in the art will appreciate that cells other than T-cells may be stimulated by binding of an agent that ligates a cell surface moiety and induces aggregation of the moiety, which in turn results in activation of a signaling pathway. Other such cell surface moieties include, but are not limited to, GPI-anchored folate receptor (CD59), human IgE receptor (FcεR1 receptor), BCR, EGF receptor, insulin receptor, ephrin B1 receptor, neurotrophin, glial-cell derived neurotrophic factor (GDNF),

hedgehog and other cholesterol-linked and palmitoylated proteins, H-Ras, integrins, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), FAS, members of the TNF receptor family, GPI-anchored proteins, doubly acylated proteins, such as the Src-family kinases, the alpha-subunit of heterotrimeric G proteins, and cytoskeletal proteins.

5 B. EXPANSION OF T-CELL POPULATION

In one aspect of the present invention, *ex vivo* T-cell expansion can be performed by isolation of T-cells and subsequent stimulation. In one embodiment of the invention, the T-cells may be stimulated by a single agent. In another embodiment, T-cells are stimulated with two agents, one that induces a primary signal and a second
10 that is a co-stimulatory signal. Ligands useful for stimulating a single signal or stimulating a primary signal and an accessory molecule that stimulates a second signal may be used in soluble form, attached to the surface of a cell, or immobilized on a surface as described herein. A ligand or agent that is attached to a surface serves as a "surrogate" antigen presenting cell (APC). In a preferred embodiment both primary
15 and secondary agents are co-immobilized on a surface. In one embodiment, the molecule providing the primary activation signal, such as a CD3 ligand, and the co-stimulatory molecule, such as a CD28 ligand, are coupled to the same surface, for example, a particle. Further, as noted earlier, one, two, or more stimulatory molecules may be used on the same or differing surfaces.

Prior to expansion, a source of T-cells is obtained from a subject. The
20 term "subject" is intended to include living organisms in which an immune response can be elicited (e.g., mammals). Examples of subjects include humans, dogs, cats, mice, rats, and transgenic species thereof. T-cells can be obtained from a number of sources, including peripheral blood mononuclear cells, bone marrow, lymph node
25 tissue, spleen tissue, and tumors. Preferably, cells from the circulating blood of an individual are obtained by apheresis or leukapheresis. The apheresis product typically contains lymphocytes, including T-cells, monocytes, granulocytes, B cells, other nucleated white blood cells, red blood cells, and platelets. In one embodiment, the cells collected by apheresis may be washed to remove the plasma fraction and to place the

cells in an appropriate buffer or media for subsequent processing steps. In one embodiment of the invention, the cells are washed with phosphate buffered saline (PBS). In an alternative embodiment, the wash solution lacks calcium and may lack magnesium or may lack many if not all divalent cations. Again, surprisingly, initial
5 activation steps in the absence of calcium lead to magnified activation. As those of ordinary skill in the art would readily appreciate a washing step may be accomplished by methods known to those in the art, such as by using a semi-automated "flow-through" centrifuge (for example, the Cobe 2991 cell processor, Baxter) according to the manufacturer's instructions. After washing, the cells may be resuspended in a
10 variety of biocompatible buffers, such as, for example, Ca-free, Mg-free PBS. Alternatively, the undesirable components of the apheresis sample may be removed and the cells directly resuspended in culture media.

In another embodiment, T-cells are isolated from peripheral blood lymphocytes by lysing the red blood cells and depleting the monocytes, for example, by
15 centrifugation through a PERCOLL™ gradient. A specific subpopulation of T-cells, such as CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, and CD45RO⁺ T-cells, can be further isolated by positive or negative selection techniques. For example, enrichment of a T-cell population by negative selection can be accomplished with a combination of antibodies directed to surface markers unique to the negatively selected cells. A preferred method
20 is cell sorting and/or selection via negative magnetic immunoadherence or flow cytometry that uses a cocktail of monoclonal antibodies directed to cell surface markers present on the cells negatively selected. For example, to enrich for CD4⁺ cells by negative selection, a monoclonal antibody cocktail typically includes antibodies to CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, and CD8.

25 With respect to monocyte depletion noted above, monocyte populations (*i.e.*, CD14⁺ cells) may be depleted from blood preparations prior to *ex vivo* expansion by a variety of methodologies, including anti-CD14 coated beads or columns, or utilization of the phagocytotic activity of these cells to facilitate removal. Accordingly, in one embodiment, the invention uses paramagnetic particles of a size sufficient to be
30 engulfed by phagocytotic monocytes. In certain embodiments, the paramagnetic

particles are commercially available beads, for example, those produced by Dynal AS under the trade name Dynabeads™. Exemplary Dynabeads™ in this regard are M-280, M-450, and M-500. In one aspect, other non-specific cells are removed by coating the paramagnetic particles with "irrelevant" proteins (e.g., serum proteins or antibodies).

- 5 Irrelevant proteins and antibodies include those proteins and antibodies or fragments thereof that do not specifically target the T-cells to be expanded. In certain embodiments the irrelevant beads include beads coated with sheep anti-mouse antibodies, goat anti-mouse antibodies, and human serum albumin.

- In brief such depletion of monocytes is performed by preincubating
10 ficoll'd whole blood or apheresed peripheral blood with a one or more varieties of irrelevant or non-antibody coupled paramagnetic particles (approx. 1 vial of beads or 4×10^9 beads to one batch of cells (typically from about 5×10^8 to about 2×10^{10} cells) for about 30 minutes to 2 hours at 22 to 37 degrees C, followed by magnetic removal of cells which have attached to or engulfed the paramagnetic particles. Such separation
15 can be performed using standard methods available in the art. For example, any magnetic separation methodology may be used including a variety of which are commercially available, (e.g., DYNAL® Magnetic Particle Concentrator (DYNAL MPC®)). Assurance of requisite depletion can be monitored by a variety of methodologies known to those of ordinary skill in the art, including flow cytometric
20 analysis of CD14 positive cells, before and after said depletion.

- Another method to prepare the T-cells for stimulation is to freeze the cells after the washing step, which does not require the monocyte-removal step. Wishing not to be bound by theory, the freeze and subsequent thaw step provides a more uniform product by removing granulocytes and to some extent monocytes in the
25 cell population. After the washing step that removes plasma and platelets, the cells may be suspended in a freezing solution. While many freezing solutions and parameters are known in the art and will be useful in this context, one method involves using PBS containing 20% DMSO and 8% human serum albumin, or other suitable cell freezing media, the cells then are frozen to -80°C. at a rate of 1° per minute and stored in the
30 vapor phase of a liquid nitrogen storage tank.

The cell population may be stimulated as described herein, such as by contact with an anti-CD3 antibody or an anti-CD2 antibody immobilized on a surface, or by contact with a protein kinase C activator (e.g., bryostatin) in conjunction with a calcium ionophore. For co-stimulation of an accessory molecule on the surface of the T-cells, a ligand that binds the accessory molecule is used. For example, a population of CD4⁺ cells can be contacted with an anti-CD3 antibody and an anti-CD28 antibody, under conditions appropriate for stimulating proliferation of the T-cells. Similarly, to stimulate proliferation of CD8⁺ T-cells, an anti-CD3 antibody and the monoclonal antibody ES5.2D8 (ATCC) can be used as can other methods commonly known in the art (Berg *et al.*, *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Hansen *et al.*, *J. Exp. Med.* 190(9):1319-1328, 1999; Garland *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).

The primary stimulatory signal and the co-stimulatory signal for the T-cell may be provided by different protocols. For example, the agents providing each signal may be in solution or coupled to a surface. When coupled to a surface, the agents may be coupled to the same surface (i.e., in "cis" formation) or to separate surfaces (i.e., in "trans" formation). Alternatively, one agent may be coupled to a surface and the other agent in solution. In one embodiment, the agent providing the co-stimulatory signal is bound to a cell surface and the agent providing the primary activation signal is in solution or coupled to a surface. In a preferred embodiment, the two agents are immobilized on beads, either on the same bead, i.e., "cis," or to separate beads, i.e., "trans." By way of example, the agent providing the primary activation signal is an anti-CD3 antibody and the agent providing the co-stimulatory signal is an anti-CD28 antibody; and both agents are co-immobilized to the same bead in equivalent molecular amounts. In one embodiment, a 1:1 ratio of each antibody bound to the beads for CD4⁺ T-cell expansion and T-cell growth is used. However, ratios of particles to cells from 1:500 to 500:1 and any integer values in between may be used to stimulate T-cells or other target cells. As those of ordinary skill in the art can readily appreciate, the ratio of particle to cells may dependant on particle size relative to the target cell. For example, small sized beads could only bind a few cells, while larger beads could bind many. In certain embodiments the ratio of cells to particles ranges from 1:100 to

W/O 01/62895

PCT/US81/06139

29

100:1 and any integer values in-between and in further embodiments the ratio comprises 1:9 to 9:1 and any integer values in between, can also be used to stimulate T-cells. The ratio of anti-CD3- and anti-CD28-coupled beads to T-cells that result in T-cell stimulation can vary as noted above, however certain preferred values include at least 1:4, 1:3, 1:2, 2:1, 3:1, 4:1 to 6:1, with one preferred ratio being at least 2:1 beads per T-cell.

Using certain methodologies it may be advantageous to maintain long-term stimulation of a population of T-cells following the initial activation and stimulation, by separating the T-cells from the stimulus after a period of about 12 to about 14 days. The rate of T-cell proliferation is monitored periodically (e.g., daily) by, for example, examining the size or measuring the volume of the T-cells, such as with a Coulter Counter. In this regard, a resting T-cell has a mean diameter of about 6.8 microns, and upon initial activation and stimulation, in the presence of the stimulating ligand, the T-cell mean diameter will increase to over 12 microns by day 4 and begin to decrease by about day 6. When the mean T-cell diameter decreases to approximately 8 microns, the T-cells may be reactivated and re-stimulated to induce further proliferation of the T-cells. Alternatively, the rate of T-cell proliferation and time for T-cell re-stimulation can be monitored by assaying for the presence of cell surface molecules, such as B7-1, B7-2, which are induced on activated T-cells.

For inducing long-term stimulation of a population of CD4⁺ and/or CD8⁺ T-cells, it may be necessary to reactivate and re-stimulate the T-cells with a stimulatory agent such as an anti-CD3 antibody and an anti-CD28 antibody or monoclonal antibody ES5.2D8 several times to produce a population of CD4⁺ or CD8⁺ cells increased in number from about 10 to about 1,000-fold the original T-cell population. Using the present methodology, it is possible to achieve T-cell numbers from about 100 to about 100,000-fold. Moreover, as described in EXAMPLE XII, T-cells expanded by the method of the present invention secrete high levels of cytokines (e.g., IL-2, IFN- γ , IL-4, GM-CSF and TNF- α) into the culture supernatants. For example, as compared to stimulation with IL-2, CD4⁺ T-cells expanded by use of anti-CD3 and anti-CD28 co-stimulation secrete high levels of GM-CSF and TNF- α into the culture medium. These

cytokines can be purified from the culture supernatants or the supernatants can be used directly for maintaining cells in culture. Similarly, the T-cells expanded by the method of the present invention together with the culture supernatant and cytokines can be administered to support the growth of cells *in vivo*.

5 In one embodiment, T-cell stimulation is performed with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies co-immobilized on beads (3x28 beads), for a period of time sufficient for the cells to return to a quiescent state (low or no proliferation) (approximately 8-14 days after initial stimulation). The stimulation signal is then removed from the cells and the cells are washed and infused back into the patient. The
10 cells at the end of the stimulation phase are rendered "super-inducible" by the methods of the present invention, as demonstrated by their ability to respond to antigens and the ability of these cells to demonstrate a memory-like phenotype, as is evidence by the examples. Accordingly, upon re-stimulation either exogenously or by an antigen *in vivo* after infusion, the activated T-cells demonstrate a robust response characterized by
15 unique phenotypic properties, such as sustained CD154 expression, increased cytokine production, etc.

In further embodiments of the present invention, the cells, such as T-cells are combined with agent-coated beads, the beads and the cells are subsequently separated, and then the cells are cultured. In an alternative embodiment, prior to
20 culture, the agent-coated beads and cells are not separated but are cultured together. In a further embodiment, the beads and cells are first concentrated by application of a force, resulting in cell surface moiety ligation, thereby inducing cell stimulation.

By way of example, when T-cells are the target cell population, the cell surface moieties may be ligated by allowing paramagnetic beads to which anti-CD3 and
25 anti-CD28 are attached (CD3xCD28 beads) to contact the T-cells prepared. In one embodiment the cells (for example, 10^4 to 10^9 per mL of T-cells) and beads (for example, 1.5×10^9 CD3xCD28 paramagnetic beads) are combined in a buffer, preferably PBS (without divalent cations such as, calcium and magnesium). Again, those of ordinary skill in the art can readily appreciate any cell concentration may be
30 used. For example, the target cell may be very rare in the sample and comprise only

0.01% of the sample or the entire sample (*i.e.* 100%) may comprise the target cell of interest. Accordingly, any cell number is within the context of the present invention.

The buffer that the cells are suspended in may be any that is appropriate for the particular cell type. When utilizing certain cell types the buffer may contain
5 other components, *e.g.* 1-5% serum, necessary to maintain cell integrity during the process. In another embodiment, the cells and beads may be combined in cell culture media. The cells and beads may be mixed, for example, by rotation, agitation or any means for mixing, for a period of time ranging from one minute to several hours. The container of beads and cells is then concentrated by a force, such as placing in a
10 magnetic field. Media and unbound cells are removed and the cells attached to the beads are washed, for example, by pumping via a peristaltic pump, and then resuspended in media appropriate for cell culture.

In one embodiment of the present invention, the mixture may be cultured for several hours (about 3 hours) to fourteen days or any hourly integer value in
15 between. In one embodiment of the invention the beads and the T-cells are cultured together for about eight days. In another embodiment, the beads and T-cells are cultured together for 2-3 days. Conditions appropriate for T-cell culture include an appropriate media (*e.g.*, Minimal Essential Media or RPMI Media 1640 or X-vivo 15, (BioWhittaker)) that may contain factors necessary for proliferation and viability,
20 including serum (*e.g.*, fetal bovine or human serum) or interleukin-2 (IL-2). Antibiotics, *e.g.*, penicillin and streptomycin, are included only in experimental cultures, not in cultures of cells that are to be infused into a subject. The target cells are maintained under conditions necessary to support growth, for example, an appropriate temperature (*e.g.*, 37° C) and atmosphere (*e.g.*, air plus 5% CO₂).

25 When using a magnetic field as the concentrating force the magnetic field strength applied to the cells prior to cell culture may be between the range of 200 gauss to 12,000 gauss on the magnetic surface. The shape and size of the magnet may be adapted to the size and shape of the mixing or cell culture vessels or to any other parameter that facilitates or increases cell to cell contact and concentration of the cells.
30 The magnetic force may be diffused by placing a material that acts as a buffer or spacer

WQ 01/62895

PCT/US81/06139

32

between the magnet and the paramagnetic beads contained within the mixture with cells. A strong magnetic force is generally considered to be at least 7500 gauss at the surface, whereas a weak magnetic force is considered to be in the range of 2000-2500 gauss at the surface. The approximate magnetic force applied by a magnet on a
 5 paramagnetic bead depends upon the volume of the paramagnetic bead and the magnetic field strength according to the following formula:

$$F_{mag} = (v) (\chi) (B) (dB/dx)$$

where F_{mag} equals the magnetic force, v equals the volume of the paramagnetic bead, χ equals the magnetic susceptibility of a paramagnetic bead (a value provided by the
 10 manufacturer), B equals the magnetic field strength, and (dB/dx) equals the field strength gradient. One of skill in the art will appreciate that the factors on the right-hand side of the equation can be obtained or measured, allowing the magnetic force applied to be calculated.

Cells stimulated by the methods of the present invention are activated as
 15 shown by the induction of signal transduction, expression cell surface markers and/or proliferation. One such marker appropriate for T-cells is CD154 which is an important immunomodulating molecule, the expression of CD154 is extremely beneficial in amplifying the immune response. CD154 interacts with the CD40 molecule expressed on many B cells, dendritic cells, monocytes, and some endothelial cells. Accordingly,
 20 this unexpected and surprising increase in CD154 expression is likely to lead to more efficacious T-cell compositions. Stimulation of CD3⁺ cells as described herein provides T-cells that express a 1.1 to 20-fold increases in the levels of certain cell surface markers such as CD154 expression on days 1, 2, 3, or 4 following stimulation. (See EXAMPLE 5, Table 2 and Figure 4.) Expression of another cell surface marker, CD25,
 25 also was greater on T-cells after concentration and stimulation than on cells prior to culture or cells stimulated by other methods. (See Table 2.)

One of skill in the art will appreciate that any target cell that can be stimulated by cell surface moiety ligation may be combined with the agent-coated surface, such as beads. Further, the agent-coated surfaces, such as, beads may be
 30 separated from the cells prior to culture, at any point during culture, or at the

termination of culture. In addition, the agent-coated surfaces ligated to the target cells may be separated from the non-binding cells prior to culture or the other cells may remain in culture as well. In one embodiment, prior to culture, the agent-coated beads and target cells are not separated but are cultured together. In a further embodiment, the beads and target cells are first concentrated by application of a force, resulting in cell surface moiety ligation, thereby inducing stimulation and subsequent activation.

Also contemplated by this invention, are other means to increase the concentration of the target cells, for example, a T-cell fraction bound to a surface coated with primary and secondary stimulatory molecules. In addition to application of a magnetic force, other forces greater than gravitational force may be applied, for example, but not limited to, centrifugal force, transmembrane pressure, and a hydraulic force. Concentration may also be accomplished by filtration.

One of skill in the art will readily appreciate that contact between the agent-coated beads and the cells to be stimulated can be increased by concentration using other forces. Accordingly, any means for concentrating cells with cell surface moiety binding ligands will be sufficient as long as the concentration brings together cells and agents in a manner that exceeds gravity or diffusion.

It should be understood that in various embodiments the agent-coated surface may be a particle, such as a bead which is mixed with the cells and concentrated in a small volume in a magnetic field, thus drawing all the particles and particle bound cells into a defined and concentrated area. In certain embodiments, the agent-coated surface may be drawn together by force within thirty seconds to four hours of being exposed to the target cells. In other embodiments the time may be from 1 minute to 2 hours, or all integer ranges in between. Application of a force to a cell population with receptor bearing cells that is mixed with a surface to which at least one cell surface ligand is attached may induce cell receptor polarization, aggregating cell surface molecules. This means for inducing cell surface polarization may enhance signaling within the cell by aggregating cell surface molecules that comprise lipid rafts. Such aggregation can induce a signal pathway, which may lead to down-regulation or

suppression of a cellular event. Alternatively, the aggregation of cell surface molecules may lead to up-regulation or activation of a cellular event.

A cellular event may include, for example, receptor-mediated signal transduction that induces or suppresses a particular pathway, including an apoptotic pathway, or induces phosphorylation of proteins, or stimulates or suppresses growth signals. In one embodiment, the cells may be lymphocytes, particularly a T-cell, and the cell surface ligand may be an anti-CD3 antibody attached to a surface, for example, a particle. The particle may be a paramagnetic bead and the force applied a magnetic force. Application of a magnetic force to a mixture of the lymphocytes and anti-CD3-coated surface of the paramagnetic bead may cause the CD3 receptors of the T-cell to polarize more quickly than would occur in the absence of an external force. This method of stimulating the T-cell promotes more rapid activation of the T-cell immune response pathways and proliferation of cells.

In another embodiment, the time of exposure to stimulatory agents such as anti-CD3/anti-CD28 (*i.e.*, CD3xCD28)-coated beads may be modified or tailored to obtain a desired T-cell phenotype. One may desire a greater population of helper T-cells (T_H), typically $CD4^+$ as opposed to $CD8^+$ cytotoxic or suppressor T-cells (T_C), because an expansion of T_H cells could improve or restore overall immune responsiveness. While many specific immune responses are mediated by $CD8^+$ antigen-specific T-cells, which can directly lyse or kill target cells, most immune responses require the help of $CD4^+$ T-cells, which express important immune-regulatory molecules, such as GM-CSF, CD40L, and IL-2, for example. Where CD4-mediated help is preferred, a method, such as that described herein, which preserves or enhances the $CD4:CD8$ ratio could be of significant benefit. Increased numbers of $CD4^+$ T-cells can increase the amount of cell-expressed CD40L introduced into patients, potentially improving target cell visibility (improved APC function). Similar effects can be seen by increasing the number of infused cells expressing GM-CSF, or IL-2, all of which are expressed predominantly by $CD4^+$ T-cells. Alternatively, in situations where CD4-help is needed less and increased numbers of $CD8^+$ T-cells are desirable, the XCELLERATE approaches described herein can also be utilized, by for example, pre-selecting for

CD8⁺ cells prior to stimulation and/or culture. Such situations may exist where increased levels of IFN- or increased cytotoxicity of a target cell is preferred.

To effectuate isolation of different T-cell populations, exposure times to the concentration force may be varied or pulsed. For example when such force is a magnet, exposure to the magnet or the magnetic field strength may be varied, and/or expansion times may be varied to obtain the specific phenotype of interest. The expression of a variety of phenotypic markers change over time; therefore, a particular time point may be chosen to obtain a specific population of T-cells. Accordingly, depending on the cell type to be stimulated, the stimulation and/or expansion time may be four weeks or less, 2 weeks or less, 10 days or less, or 8 days or less (four weeks or less includes all time ranges from 4 weeks down to 1 day (24 hours)). In some embodiments, stimulation and expansion may be carried out for 6 days or less, 4 days or less, 2 days or less, and in other embodiments for as little as 24 or less hours, and preferably 4-6 hours or less (these ranges include any integer values in between). When stimulation of T-cells is carried out for shorter periods of time, the population of T-cells may not increase in number as dramatically, but the population will provide more robust and healthy activated T-cells that can continue to proliferate *in vivo* and more closely resemble the natural effector T-cell pool. As the availability of T-cell help is often the limiting factor in antibody responses to protein antigens, the ability to selectively expand or selectively infuse a CD4⁺ rich population of T-cells into a subject is extremely beneficial. Further benefits of such enriched populations are readily apparent in that activated helper T-cells that recognize antigens presented by B lymphocytes deliver two types of stimuli, physical contact and cytokine production, that result in the proliferation and differentiation of B cells.

T-cells that have been exposed to varied stimulation times may exhibit different characteristics. For example, typical blood or apheresed peripheral blood mononuclear cell products have a helper T-cell population (T_H, CD4⁺) that is greater than the cytotoxic or suppressor T-cell population (T_C, CD8⁺). *Ex vivo* expansion of T-cells by stimulating CD3 and CD28 receptors produces a population of T-cells that prior to about days 8-9 consists predominately of T_H cells, while after about days 8-9,

the population of T-cells comprises an increasingly greater population of T_C cells. Accordingly, depending on the purpose of treatment, infusing a subject with a T-cell population comprising predominately of T_H cells may be advantageous. Similarly, if an antigen-specific subset of T_C cells has been isolated it may be beneficial to expand this

5 subset to a greater degree.

Further, in addition to CD4 and CD8 markers, other phenotypic markers vary significantly, but in large part, reproducibly during the course of the cell expansion process. Thus, such reproducibility enables the ability to tailor an activated T-cell product for specific purposes.

10 In one such example, among the important phenotypic markers that reproducibly vary with time are the high affinity IL-2 receptor (CD25), CD40 ligand (CD154), and CD45RO (a molecule that by preferential association with the TCR may increase the sensitivity of the TCR to antigen binding). As one of ordinary skill in the art readily appreciates, such molecules are important for a variety of reasons. For

15 example, CD25 constitutes an important part of the autocrine loop that allows rapid T-cell division. CD154 has been shown to play a key role in stimulating maturation of the antigen-presenting dendritic cells; activating B-cells for antibody production; regulating T_H cell proliferation; enhancing T_C cell differentiation; regulating cytokine secretion of both T_H cells and antigen-presenting cells; and stimulating expression of co-stimulatory

20 ligands, including CD80, CD86, and CD154.

Cytokine production peaks in the first few days of the *ex vivo* expansion process. Accordingly, because cytokines are known to be important for mediating T-cell activation and function as well as immune response modulation, such cytokines are likely critical in the development of a therapeutic T-cell product, that is able to undergo

25 reactivation upon contact with an additional antigen challenge. Cytokines important in this regard, include, but are not limited to, IL-2, IL-4, TNF-, and IFN-. Thus, by obtaining a population of T-cells during the first few days of expansion and infusing these cells into a subject, a therapeutic benefit may occur in which additional activation and expansion of T-cells *in vivo* occurs.

In addition to the cytokines and the markers discussed previously, expression of adhesion molecules known to be important for mediation of T-cell activation and immune response modulation also change dramatically but reproducibly over the course of the *ex vivo* expansion process. For example, CD62L is important for homing of T-cells to lymphoid tissues and trafficking T-cells to sites of inflammation. Under certain circumstances of disease and injury, the presence of activated T-cells at these sites may be disadvantageous. Because down-regulation of CD62L occurs early following activation, the T-cells could be expanded for shorter periods of time. Conversely, longer periods of time in culture would generate a T-cell population with higher levels of CD62L and thus a higher ability to target the activated T-cells to these sites under other preferred conditions. Another example of a polypeptide whose expression varies over time is CD49d, an adhesion molecule that is involved in trafficking lymphocytes from blood to tissues spaces at sites of inflammation. Binding of the CD49d ligand to CD49d also allows the T-cell to receive co-stimulatory signals for activation and proliferation through binding by VCAM-1 or fibronectin ligands. The expression of the adhesion molecule CD54, involved in T-cell-APC and T-cell-T-cell interactions as well as homing to sites of inflammation, also changes over the course of expansion. Accordingly, T-cells could be stimulated for selected periods of time that coincide with the marker profile of interest and subsequently collected and infused. Thus, T-cell populations could be tailored to express the markers believed to provide the most therapeutic benefit for the indication to be treated.

In the various embodiments, one of ordinary skill in the art understands removal of the stimulation signal from the cells is dependent upon the type of surface used. For example, if paramagnetic beads are used, then magnetic separation is the feasible option. Separation techniques are described in detail by paramagnetic bead manufacturers' instructions (for example, DYNAL Inc., Oslo, Norway). Furthermore, filtration may be used if the surface is a bead large enough to be separated from the cells. In addition, a variety of transfusion filters are commercially available, including 20 micron and 80 micron transfusion filters (Baxter). Accordingly, so long as the beads are larger than the mesh size of the filter, such filtration is highly efficient. In a related

WO 01/62895

PC/FUSBL/06139

38

cribdoment, the beads may pass through the filter, but cells may remain, thus allowing separation.

Although the antibodies used in the methods described herein can be readily obtained from public sources, such as the ATCC, antibodies to T-cell accessory molecules and the CD3 complex can be produced by standard techniques. Methodologies for generating antibodies for use in the methods of the invention are well-known in the art and are discussed in further detail herein.

C. LIGAND IMMOBILIZATION ON A SURFACE

As indicated above, the methods of the present invention preferably use ligands bound to a surface. The surface may be any surface capable of having a ligand bound thereto or integrated into and that is biocompatible, that is, substantially non-toxic to the target cells to be stimulated. The biocompatible surface may be biodegradable or non-biodegradable. The surface may be natural or synthetic, and a synthetic surface may be a polymer. The surface may comprise collagen, purified proteins, purified peptides, polysaccharides, glycosaminoglycans, or extracellular matrix compositions. A polysaccharide may include for example, cellulose, agarose, dextran, chitosan, hyaluronic acid, or alginate. Other polymers may include polyesters, polyethers, polyanhydrides, polyalkylcyanoacrylates, polyacrylamides, polyorthoesters, polyphosphazenes, polyvinylacetates, block copolymers, polypropylene, polytetrafluorethylene (PTFE), or polyurethanes. The polymer may be lactic acid or a copolymer. A copolymer may comprise lactic acid and glycolic acid (PLGA). Non-biodegradable surfaces may include polymers, such as poly(dimethylsiloxane) and poly(ethylene-vinyl acetate). Biocompatible surfaces include for example, glass (e.g., bioglass), collagen, metal, hydroxyapatite, aluminate, bioceramic materials, hyaluronic acid polymers, alginate, acrylic ester polymers, lactic acid polymer, glycolic acid polymer, lactic acid/glycolic acid polymer, purified proteins, purified peptides, or extracellular matrix compositions. Other polymers comprising a surface may include glass, silica, silicon, hydroxyapatite, hydrogels, collagen, acrolein, polyacrylamide, polypropylene, polystyrene, nylon, or any number

of plastics or synthetic organic polymers, or the like. The surface may comprise a biological structure, such as a liposome. The surface may be in the form of a lipid, a plate, bag, pellet, fiber, mesh, or particle. A particle may include, a colloidal particle, a microsphere, nanoparticle, a bead, or the like. In the various embodiments, commercially available surfaces, such as beads or other particles, are useful (e.g., Miltenyi Particles, Miltenyi Biotec, Germany; Sepharose beads, Pharmacia Fine Chemicals, Sweden; DYNABEADSTM, Dynal Inc., New York, PURABEADSTM, Prometic Biosciences).

When beads are used, the bead may be of any size that effectuates target cell stimulation. In one embodiment, beads are preferably from about 5 nanometers to about 500 μm in size. Accordingly, the choice of bead size depends on the particular use the bead will serve. For example, if the bead is used for monocyte depletion, a small size is chosen to facilitate monocyte ingestion (e.g., 2.8 μm and 4.5 μm in diameter or any size that may be engulfed, such nanometer sizes); however, when separation of beads by filtration is desired, bead sizes of no less than 50 μm are typically used. Further, when using paramagnetic beads, the beads typically range in size from about 2.8 μm to about 500 μm and more preferably from about 2.8 μm to about 50 μm . Lastly, one may choose to use super-paramagnetic nanoparticles which can be as small as about 10 nm. Accordingly, as is readily apparent from the discussion above, virtually any particle size may be utilized.

An agent may be attached or coupled to, or integrated into a surface by a variety of methods known and available in the art. The agent may be a natural ligand, a protein ligand, or a synthetic ligand. The attachment may be covalent or noncovalent, electrostatic, or hydrophobic and may be accomplished by a variety of attachment means, including for example, chemical, mechanical, enzymatic, or other means whereby a ligand is capable of stimulating the cells. For example, the antibody to a ligand first may be attached to a surface, or avidin or streptavidin may be attached to the surface for binding to a biotinylated ligand. The antibody to the ligand may be attached to the surface via an anti-idiotypic antibody. Another example includes using protein A or protein G, or other non-specific antibody binding molecules, attached to

WO 01/62895

PC/PUSHL/06139

40

surfaces to bind an antibody. Alternatively, the ligand may be attached to the surface by chemical means, such as cross-linking to the surface, using commercially available cross-linking reagents (Pierce, Rockford, IL) or other means. In certain embodiments, the ligands are covalently bound to the surface. Further, in one embodiment, commercially available tosyl-activated DYNABEADS™ or DYNABEADS™ with epoxy-surface reactive groups are incubated with the polypeptide ligand of interest according to the manufacturer's instructions. Briefly, such conditions typically involve incubation in a phosphate buffer from pH 4 to pH 9.5 at temperatures ranging from 4 to 37 degrees C.

10 In one aspect, the agent, such as certain ligands may be of singular origin or multiple origins and may be antibodies or fragments thereof while in another aspect, when utilizing T-cells, the co-stimulatory ligand is a B7 molecule (e.g., B7-1, B7-2). These ligands are coupled to the surface by any of the different attachment means discussed above. The B7 molecule to be coupled to the surface may be isolated from a cell expressing the co-stimulatory molecule, or obtained using standard recombinant DNA technology and expression systems that allow for production and isolation of the co-stimulatory molecule(s) as described herein. Fragments, mutants, or variants of a B7 molecule that retain the capability to trigger a co-stimulatory signal in T-cells when coupled to the surface of a cell can also be used. Furthermore, one of ordinary skill in the art will recognize that any ligand useful in the activation and induction of proliferation of a subset of T-cells may also be immobilized on beads or culture vessel surfaces or any surface. In addition, while covalent binding of the ligand to the surface is one preferred methodology, adsorption or capture by a secondary monoclonal antibody may also be used. The amount of a particular ligand attached to a surface may be readily determined by flow cytometry (FACS) analysis if the surface is that of beads or determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) if the surface is a tissue culture dish, mesh, fibers, bags, for example.

25 In a particular embodiment, the stimulatory form of a B7 molecule or an anti-CD28 antibody or fragment thereof is attached to the same solid phase surface as the agent that stimulates the TCR/CD3 complex, such as an anti-CD3 antibody. In 30

addition to anti-CD3 antibodies, other antibodies that bind to receptors that mimic antigen signals may be used. For example, the beads or other surfaces may be coated with combinations of anti-CD2 antibodies and a B7 molecule and in particular anti-CD3 antibodies and anti-CD28 antibodies.

5 D. AGENTS

Agents contemplated by the present invention include protein ligands, natural ligands, and synthetic ligands. Agents that can bind to cell surface moieties, and under certain conditions, cause ligation and aggregation that leads to signalling include, but are not limited to, lectins (for example, PHA, lentil lectins, concanavalin A),
 10 antibodies, antibody fragments, peptides, polypeptides, glycopeptides, receptors, B cell receptor and T-cell receptor ligands, extracellular matrix components, steroids, hormones (for example, growth hormone, corticosteroids, prostaglandins, tetra-iodo
 thyronine), bacterial moieties (such as lipopolysaccharides), mitogens, antigens, superantigens and their derivatives, growth factors, cytokine, viral proteins (for
 15 example, HIV gp-120), adhesion molecules (such as, L-selectin, LFA-3, CD54, LFA-1), chemokines, and small molecules. The agents may be isolated from natural sources such as cells, blood products, and tissues, or isolated from cells propagated *in vitro*, or prepared recombinantly, or by other methods known to those with skill in the art.

In one aspect of the present invention, when it is desirable to stimulate T-
 20 cells, useful agents include ligands that are capable of binding the CD3/TCR complex, CD2, and/or CD28 and initiating activation or proliferation, respectively. Accordingly, the term ligand includes those proteins that are the "natural" ligand for the cell surface protein, such as a B7 molecule for CD28, as well as artificial ligands such as antibodies directed to the cell surface protein. Such antibodies and fragments thereof may be
 25 produced in accordance with conventional techniques, such as hybridoma methods and recombinant DNA and protein expression techniques. Useful antibodies and fragments may be derived from any species, including humans, or may be formed as chimeric proteins, which employ sequences from more than one species.

Methods well known in the art may be used to generate antibodies, polyclonal antisera, or monoclonal antibodies that are specific for a ligand. Antibodies also may be produced as genetically engineered immunoglobulins (Ig) or Ig fragments designed to have desirable properties. For example, by way of illustration and not
5 limitation, antibodies may include a recombinant IgG that is a chimeric fusion protein having at least one variable (V) region domain from a first mammalian species and at least one constant region domain from a second distinct mammalian species. Most commonly, a chimeric antibody has murine variable region sequences and human constant region sequences. Such a murine/human chimeric immunoglobulin may be
10 "humanized" by grafting the complementarity determining regions (CDRs), which confer binding specificity for an antigen, derived from a murine antibody into human-derived V region framework regions and human-derived constant regions. Fragments of these molecules may be generated by proteolytic digestion, or optionally, by proteolytic digestion followed by mild reduction of disulfide bonds and alkylation, or
15 by recombinant genetic engineering techniques.

Antibodies are defined to be "immunospecific" if they specifically bind the ligand with an affinity constant, K_a , of greater than or equal to about 10^4 M^{-1} , preferably of greater than or equal to about 10^5 M^{-1} , more preferably of greater than or equal to about 10^6 M^{-1} , and still more preferably of greater than or equal to about 10^7
20 M^{-1} . Affinities of binding partners or antibodies can be readily determined using conventional techniques, for example, those described by Scatchard *et al.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 51:660, 1949) or by surface plasmon resonance (BIAcore, Biosensor, Piscataway, NJ) See, e.g., Wolff *et al.*, *Cancer Res.*, 53:2560-2565, 1993).

Antibodies may generally be prepared by any of a variety of techniques
25 known to those having ordinary skill in the art (See, e.g., Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory). In one such technique, an animal is immunized with the ligand as antigen to generate polyclonal antisera. Suitable animals include rabbits, sheep, goats, pigs, cattle, and may include smaller mammalian species, such as, mice, rats, and hamsters.

An immunogen may be comprised of cells expressing the ligand, purified or partially purified ligand polypeptides or variants or fragments thereof, or ligand peptides. Ligand peptides may be generated by proteolytic cleavage or may be chemically synthesized. Peptides for immunization may be selected by analyzing the
5 primary, secondary, or tertiary structure of the ligand according to methods known to those skilled in the art in order to determine amino acid sequences more likely to generate an antigenic response in a host animal (See, e.g., Novotny, *Mol. Immunol.* 28:201-207, 1991; Betzoksky, *Science* 229:932-40, 1985).

Preparation of the immunogen may include covalent coupling of the
10 ligand polypeptide or variant or fragment thereof, or peptide to another immunogenic protein, such as, keyhole limpet hemocyanin or bovine serum albumin. In addition, the peptide, polypeptide, or cells may be emulsified in an adjuvant (See Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988 Cold Spring Harbor Laboratory). In general, after the first injection, animals receive one or more booster immunizations according
15 to a preferable schedule for the animal species. The immune response may be monitored by periodically bleeding the animal, separating the sera, and analyzing the sera in an immunoassay, such as an Ouchterlony assay, to assess the specific antibody titer. Once an antibody titer is established, the animals may be bled periodically to accumulate the polyclonal antisera. Polyclonal antibodies that bind specifically to the
20 ligand polypeptide or peptide may then be purified from such antisera, for example, by affinity chromatography using protein A or using the ligand polypeptide or peptide coupled to a suitable solid support.

Monoclonal antibodies that specifically bind ligand polypeptides or fragments or variants thereof may be prepared, for example, using the technique of
25 Kohler and Milstein (*Nature*, 256:495-497, 1975; *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976) and improvements thereto. Hybridomas, which are immortal eucaryotic cell lines, may be generated that produce antibodies having the desired specificity to a the ligand polypeptide or variant or fragment thereof. An animal—for example, a rat, hamster, or preferably mouse—is immunized with the ligand immunogen prepared as described
30 above. Lymphoid cells, most commonly, spleen cells, obtained from an immunized

WO 01/02895

PCT/US91/06139

44

animal may be immortalized by fusion with a drug-sensitized myeloma cell fusion partner, preferably one that is syngeneic with the immunized animal. The spleen cells and myeloma cells may be combined for a few minutes with a membrane fusion-promoting agent, such as polyethylene glycol or a nonionic detergent, and then plated at low density on a selective medium that supports the growth of hybridoma cells, but not myeloma cells. A preferred selection media is HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine). After a sufficient time, usually about 1 to 2 weeks, colonies of cells are observed. Single colonies are isolated, and antibodies produced by the cells may be tested for binding activity to the ligand polypeptide or variant or fragment thereof.

10 Hybridomas producing antibody with high affinity and specificity for the ligand antigen are preferred. Hybridomas that produce monoclonal antibodies that specifically bind to a ligand polypeptide or variant or fragment thereof are contemplated by the present invention.

Monoclonal antibodies may be isolated from the supernatants of hybridoma cultures. An alternative method for production of a murine monoclonal antibody is to inject the hybridoma cells into the peritoneal cavity of a syngeneic mouse. The mouse produces ascites fluid containing the monoclonal antibody. Contaminants may be removed from the antibody by conventional techniques, such as chromatography, gel filtration, precipitation, or extraction.

20 Human monoclonal antibodies may be generated by any number of techniques. Methods include but are not limited to, Epstein Barr Virus (EBV) transformation of human peripheral blood cells (see, U. S. Patent No. 4,464,456), *in vitro* immunization of human B cells (see, e.g., Boerner *et al.*, *J. Immunol.* 147:86-95, 1991), fusion of spleen cells from immunized transgenic mice carrying human immunoglobulin genes and fusion of spleen cells from immunized transgenic mice carrying immunoglobulin genes inserted by yeast artificial chromosome (YAC) (see, e.g., U. S. Patent No. 5,877,397; Bruggermann *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-58, 1997; Jakobovits *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:525-35, 1995), or isolation from human immunoglobulin V region phage libraries.

Chimeric antibodies and humanized antibodies for use in the present invention may be generated. A chimeric antibody has at least one constant region domain derived from a first mammalian species and at least one variable region domain derived from a second distinct mammalian species (See, e.g., Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-55, 1984). Most commonly, a chimeric antibody may be constructed by cloning the polynucleotide sequences that encode at least one variable region domain derived from a non-human monoclonal antibody, such as the variable region derived from a murine, rat, or hamster monoclonal antibody, into a vector containing sequences that encode at least one human constant region. (See, e.g., Shin *et al.*, *Methods Enzymol.* 178:459-76, 1989; Walls *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21:2921-29, 1993). The human constant region chosen may depend upon the effector functions desired for the particular antibody. Another method known in the art for generating chimeric antibodies is homologous recombination (U.S. Patent No. 5,482,856). Preferably, the vectors will be transfected into eukaryotic cells for stable expression of the chimeric antibody.

A non-human/human chimeric antibody may be further genetically engineered to create a "humanized" antibody. Such an antibody has a plurality of CDRs derived from an immunoglobulin of a non-human mammalian species, at least one human variable framework region, and at least one human immunoglobulin constant region. Humanization may yield an antibody that has decreased binding affinity when compared with the non-human monoclonal antibody or the chimeric antibody. Those having skill in the art, therefore, use one or more strategies to design humanized antibodies.

Within certain embodiments, the use of antigen-binding fragments of antibodies may be preferred. Such fragments include Fab fragments or F(ab')₂ fragments, which may be prepared by proteolytic digestion with papain or pepsin, respectively. The antigen binding fragments may be separated from the Fc fragments by affinity chromatography, for example, using immobilized protein A or immobilized ligand polypeptide or a variant or a fragment thereof. An alternative method to generate Fab fragments includes mild reduction of F(ab')₂ fragments followed by

alkylation (See, e.g., Weir, *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, Blackwell Scientific, Boston).

Non-human, human, or humanized heavy chain and light chain variable regions of any of the above described Ig molecules may be constructed as single chain

- 5 Fv (sFv) fragments (single chain antibodies). See, e.g., Bird *et al.*, *Science* 242:423-426, 1988; Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988. Multi-functional fusion proteins may be generated by linking polynucleotide sequences encoding an sFv in-frame with polynucleotide sequences encoding various effector proteins. These methods are known in the art, and are disclosed, for example, in EP-B1-0318554, U.S. Patent No. 5,132,405, U.S. Patent No. 5,091,513, and U.S. Patent No. 5,476,786.

- 10 An additional method for selecting antibodies that specifically bind to a ligand polypeptide or variant or fragment thereof is by phage display (See, e.g., Winter *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-55, 1994; Burton *et al.*, *Adv. Immunol.* 57:191-280, 1994). Human or murine immunoglobulin variable region gene combinatorial libraries may be created in phage vectors that can be screened to select Ig fragments (Fab, Fv, sFv, or multimers thereof) that bind specifically to a ligand polypeptide or variant or fragment thereof (See, e.g., U.S. Patent No. 5,223,409; Huse *et al.*, *Science* 246:1275-81, 1989; Kang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363-66, 1991; Hoogenboom *et al.*, *J. Molec. Biol.* 227:381-388, 1992; Schlebusch *et al.*, *Hybridoma* 16:47-52, 1997 and references cited therein).

Cell Populations

As discussed above, the present invention has broad applicability to any cell type having a cell surface moiety that one is desirous of ligating. In this regard, many cell signaling events can be enhanced by the methods of the present invention.

- 25 Such methodologies can be used therapeutically in an *ex vivo* setting to activate and stimulate cells for infusion into a patient or could be used *in vivo*, to induce cell signaling events on a target cell population. However, as also noted above, the prototypic example provided herein is directed to T-cells, but is in no way limited thereto.

WD 01/62/95

PCT/US01/06139

47

With respect to T-cells, the T-cell populations resulting from the various expansion methodologies described herein may have a variety of specific phenotypic properties, depending on the conditions employed. Such phenotypic properties include enhanced expression of CD25, CD154, IFN- and GM-CSF, as well as altered expression of CD137, CD134, CD62L, and CD49d. The ability to differentially control the expression of these moieties may be very important. For example, higher levels of surface expression of CD154 on "tailored T-cells," through contact with CD40 molecules expressed on antigen-presenting cells (such as dendritic cells, monocytes, and even leukemic B cells or lymphomas), will enhance antigen presentation and immune function. Such strategies are currently being employed by various companies to ligate CD40 via antibodies or recombinant CD40L. The approach described herein permits this same signal to be delivered in a more physiological manner, e.g., by the T-cell. The ability to increase IFN- secretion by tailoring the T-cell activation (XCELLERATE) process could help promote the generation of TH1-type immune responses, important for anti-tumor and anti-viral responses. Like CD154, increased expression of GM-CSF can serve to enhance APC function, particularly through its effect on promoting the maturation of APC progenitors into more functionally competent APC, such as dendritic cells. Altering the expression of CD137 and CD134 can effect a T-cell's ability to resist or be susceptible to apoptotic signals. Controlling the expression of adhesion/homing receptors, such as CD62L and/or CD49d may determine the ability of infused T-cells to home to lymphoid organs, sites of infection, or tumor sites.

An additional aspect of the present invention provides a T-cell population or composition that has been depleted of CD8⁺ or CD4⁺ cells prior to expansion. In one embodiment, CD8⁺ cells are depleted by antibodies directed to the CD8⁺ marker. One of ordinary skill in the art would readily be able to identify a variety of particular methodologies for depleting a sample of CD8⁺ or CD4⁺ cells or conversely enriching the CD4⁺ or CD8⁺ cell content. With respect to enriching for CD4⁺ cells, one aspect of the present invention is focused on the identification of an extremely robust CD154 expression profile upon stimulation of T-cell populations wherein T_H (CD8⁺)

WO 01/62895

PCT/US01/06139

48

cells have been depleted. As indicated above, CD154 is an important immunomodulating molecule whose expression is extremely beneficial in amplifying the immune response. Accordingly an increase in CD154 expression is likely to lead to more efficacious T-cell compositions.

5 The phenotypic properties of T-cell populations of the present invention can be monitored by a variety of methods including standard flow cytometry methods and ELISA methods known by those skilled in the art.

Those of ordinary skill in the art will readily appreciate that the cell stimulation methodologies described herein may be carried out in a variety of
10 environments (i.e., containers). For example, such containers may be culture flasks, culture bags, or any container capable of holding cells, preferably in a sterile environment. In one embodiment of the present invention a bioreactor is also useful. For example, several manufacturers currently make devices that can be used to grow cells and be used in combination with the methods of the present invention. See for
15 example, Celsyne Corp., Houston, TX; Unisyn Technologies, Hopkinton, MA; Synthecon, Inc. Houston, TX; Astrum Biosciences, Inc. Ann Arbor, MI; Wave Biotech LLC, Bedminster, NJ. Further, patents covering such bioreactors include U.S. Patent Nos: 6,096,532; 5,985,653; 5,888,807; 5,190,878, which are incorporated herein by reference.

20 Methods of Use

In addition to the methods described above, cells stimulated and/or activated by the methods herein described may be utilized in a variety of contexts. With respect to the prototypic example of T-cells, the herein described methodologies can be used to selectively expand a population of CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, or
25 CD45RO⁺ T-cells for use in the treatment of infectious diseases, cancer, and immunotherapy. As a result, a phenotypically unique population of T-cells, which is polyclonal with respect to antigen reactivity, but essentially homogeneous with respect to either CD4⁺ or CD8⁺ can be produced. In addition, the method allows for the expansion of a population of T-cells in numbers sufficient to reconstitute an

individual's total CD4⁺ or CD8⁺ T-cell population (the population of lymphocytes in an individual is approximately 10¹¹). The resulting T-cell population can also be genetically transduced and used for immunotherapy or can be used in methods of *in vitro* analyses of infectious agents. For example, a population of tumor-infiltrating lymphocytes can be obtained from an individual afflicted with cancer and the T-cells stimulated to proliferate to sufficient numbers. The resulting T-cell population can be genetically transduced to express tumor necrosis factor (TNF) or other proteins and given to the individual.

One particular use for the CD4⁺ T-cells populations of the invention is the treatment of HIV infection in an individual. Prolonged infection with HIV eventually results in a marked decline in the number of CD4⁺ T lymphocytes. This decline, in turn, causes a profound state of immunodeficiency, rendering the patient susceptible to an array of life threatening opportunistic infections. Replenishing the number of CD4⁺ T-cells to normal levels may be expected to restore immune function to a significant degree. Thus, the method described herein provides a means for selectively expanding CD4⁺ T-cells to sufficient numbers to reconstitute this population in an HIV infected patient. It may also be necessary to avoid infecting the T-cells during long-term stimulation or it may be desirable to render the T-cells permanently resistant to HIV infection. There are a number of techniques by which T-cells may be rendered either resistant to HIV infection or incapable of producing virus prior to restoring the T-cells to the infected individual. For example, one or more anti-retroviral agents can be cultured with CD4⁺ T-cells prior to expansion to inhibit HIV replication or viral production (e.g., drugs that target reverse transcriptase and/or other components of the viral machinery, see e.g., Chow *et al. Nature* 361:650-653, 1993).

Several methods can be used to genetically transduce T-cells to produce molecules which inhibit HIV infection or replication. For example, in various embodiments, T-cells can be genetically transduced to produce transdominant inhibitors, "molecular decoys", antisense molecules, or toxins. Such methodologies are described in further detail in U.S. Patent Application Nos. 08/253,751, 08/253,964,

and PCT Publication No. WO 95/33823, which are incorporated herein by reference in their entirety.

The methods for stimulating and expanding a population of antigen specific T-cells are useful in therapeutic situations where it is desirable to up-regulate an immune response (e.g., induce a response or enhance an existing response) upon administration of the T-cells to a subject. For example, the method can be used to enhance a T-cell response against tumor-associated antigens. Tumor cells from a subject typically express tumor-associated antigens but may be unable to stimulate a co-stimulatory signal in T-cells (e.g., because they lack expression of co-stimulatory molecules). Thus, tumor cells can be contacted with T-cells from the subject *in vitro* and antigen specific T-cells expanded according to the method of the invention and the T-cells returned to the subject.

Accordingly, in one embodiment malignancies such as non-Hodgkins Lymphoma (NHL) and B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) can be treated. While initial studies using expanded T-cells have been tested in NHL, (see Liebowitz *et al.*, *Curr. Opin. Onc.* 10:533-541, 1998), the T-cell populations of the present invention offer unique phenotypic characteristics that can dramatically enhance the success of immunotherapy by providing increased engraftment (likely supplied by stimulation of the CD28 signal) and reactivity. However, patients with B-CLL present special difficulties, including low relative T-cell numbers with high leukemic cell burden in the peripheral blood, accompanied by a general T-cell immunosuppression. The T-cell populations of the present invention can provide dramatically improved efficacy in treating this disease and especially when combined with stem cell (CD34⁺) transplantation therapy. Accordingly, increasing T-cell function and anti-CLL T-cell activity with anti-CD3 x anti-CD28 co-immobilized beads would be beneficial.

For example, given that deficient expression of CD154, the ligand for CD40, on T-cells of B-CLL patients has been cited as a major immunological defect of the disease, the T-cell populations of the present invention, which may provide sustained high levels of CD154 expression upon re-infusion, could aid in its treatment. Investigators report that in CLL the capability of a patient's T-cells to express CD154

is defective as well as the capability of the leukemic B-cells to express CD80 and CD86. The failure of leukemic B-cells in CLL to adequately express the ligands for CD28, could result in failure to fully activate tumor-responsive T-cells and, therefore, may represent the mechanism underlying the T-cells' apparent state of tolerance.

- 5 Studies in which CD40 is engaged on CLL B cells, either via soluble anti-CD40 antibodies or via CD154-transduced leukemic B-cells, appears to correct the defect in CD80 and CD86 expression and up-regulates MHC surface expression. Kato *et al.*, *J. Clin. Invest.* 107:1133-1141, 1998; Raubheim and Kipps, *J. Exp. Med.* 177:925-935, 1993. Cells treated in this way were able to stimulate specific T-cell anti-tumor
- 10 responses.

With the enhanced expression of CD154 on the surface of the T-cell population of the present invention such T-cells would be expected to interact with autologous B-CLL cells, and would thus increase that tumor's immunogenicity by driving up expression of MHC, CD80, and CD86. This, in turn, should lead to a strong

15 anti-tumor response. Further, one of ordinary skill in the art would readily understand that treatment of a patient with *ex vivo* expanded T-cells of the present invention may be combined with traditional cancer therapies such as chemotherapy. In this regard, for example, a patient may be treated with an agent such as fludarabine or campath, followed by infusion with T-cell populations of the present invention or both.

- 20 Alternatively, T-cells can be stimulated and expanded as described herein to induce or enhance responsiveness to pathogenic agents, such as viruses (e.g., human immunodeficiency virus), bacteria, parasites and fungi.

The invention further provides methods to selectively expand a specific subpopulation of T-cells from a mixed population of T-cells. In particular, the

25 invention provides specifically enriched populations of T-cells that have much higher ratio of CD4⁺ and CD8⁺ double positive T-cells.

Another embodiment of the invention, provides a method for selectively expanding a population of T_H cells from a population of CD4⁺ T-cells. In this method, CD4⁺ T-cells are co-stimulated with an anti-CD28 antibody, such as the monoclonal

antibody 9.3, inducing secretion of T_H1 -specific cytokines, including IFN- γ , resulting in enrichment of T_H1 cells over T_H2 cells.

The observation herein that phenotypic traits of activated T-cells vary over time during the expansion process, combined with the fact that T-cells have been demonstrated to be activated within a few hours (Iezzi *et al.*, *Immunity* 8:89-95, 1998). Accordingly, in combination with the methodologies herein described, this provides the ability to expand a tailor made subset of a T-cell population in a short period of time. In one embodiment, this technique can be utilized at the bedside of a subject, in an outpatient modality, or at a subject's home, similar to the use of kidney dialysis. For example, a method or device wherein T-cells are incubated in contact with activation signals (e.g., anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, and the like) and returned to the patient immediately in a continuous flow or after a few hour expansion period. In one aspect, such techniques of expansion could use isolated chambers with filter components, such that 3x28 beads or similarly coated microparticles are mixed with a continuous flow of blood/ concentrated cells. In another embodiment, solid surfaces within an apparatus may be coated or conjugated directly (including covalently) or indirectly (e.g., streptavidin/biotin and the like) to with antibodies or other components to stimulate T-cell activation and expansion. For example, a continuous fluid path from the patient through a blood/cell collection device and/or a disposable device containing two or more immobilized antibodies (e.g., anti-CD3 and anti-CD28) or other components to stimulate receptors required for T-cell activation prior to cells returning to the subject can be utilized (immobilized on plastic surfaces or upon separable microparticles). Such a system could involve a leukapheresis instrument with a disposable set sterile docked to the existing manufacturers disposable set, or be an adaptation to the manufacturer's disposable set (e.g., the surface platform on which the antibodies/activation components are immobilized/contained is within the bag/container for collection of peripheral blood mononuclear cells during apheresis). Further, the solid surface/surface platform may be a part of a removal insert which is inserted into one of the device chambers or physically present within one of the disposable components. In another embodiment of the continuous flow aspect discussed above,

the system may comprise contacting the cells with the activating components at room temperature or at physiologic temperature using a chamber within a blood collection device or an incubation chamber set up in series with the flow path to the patient.

- In another example, blood is drawn into a stand-alone disposable device
- 5 directly from the patient that contains two or more immobilized antibodies (e.g., anti-CD3 and anti-CD28) or other components to stimulate receptors required for T-cell activation prior to the cells being administered to the subject (e.g., immobilized on plastic surfaces or upon separable microparticles). In one embodiment, the disposable device may comprise a container (e.g., a plastic bag, or flask) with appropriate tubing
- 10 connections suitable for combining/docking with syringes and sterile docking devices. This device will contain a solid surface for immobilization of T-cell activation components (e.g., anti-CD3 and anti-CD28 antibodies); these may be the surfaces of the container itself or an insert and will typically be a flat surface, an etched flat surface, an irregular surface, a porous pad, fiber, clinically acceptable/safe ferro-fluid, beads, etc.).
- 15 Additionally when using the stand-alone device, the subject can remain connected to the device, or the device can be separable from the patient. Further, the device may be utilized at room temperature or incubated at physiologic temperature using a portable incubator.

- As devices and methods for collecting and processing blood and blood
- 20 products are well known, one of skill in the art would readily recognize that given the teachings provided herein, that a variety of devices that fulfil the needs set forth above may be readily designed or existing devices modified. Accordingly, as such devices and methods are not limited by the specific embodiments set forth herein, but would include any device or methodology capable of maintaining sterility and which
- 25 maintains blood in a fluid form in which complement activation is reduced and wherein components necessary for T-cell activation (e.g., anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or ligands thereof) may be immobilized or separated from the blood or blood product prior to administration to the subject. Further, as those of ordinary skill in the art can readily appreciate a variety of blood products can be utilized in conjunction with the devices
- 30 and methods described herein. For example the methods and devices could be used to

provide rapid activation of T-cells from cryopreserved whole blood, peripheral blood mononuclear cells, other cryopreserved blood-derived cells, or cryopreserved T-cell lines upon thaw and prior to subject administration. In another example, the methods and devices can be used to boost the activity of a previously *ex vivo* expanded T-cell product prior to administration to the subject, thus providing a highly activated T-cell product. Lastly, as will be readily appreciated the methods and devices above may be utilized for autologous or allogeneic cell therapy simultaneously with the subject and donor.

The methods of the present invention may also be utilized with vaccines to enhance reactivity of the antigen and enhance *in vivo* effect. Further, given that T-cells expanded by the present invention have a relatively long half-life in the body, these cells could act as perfect vehicles for gene therapy, by carrying a desired nucleic acid sequence of interest and potentially homing to sites of cancer, disease, or infection. Accordingly, the cells expanded by the present invention may be delivered to a patient in combination with a vaccine, one or more cytokines, one or more therapeutic antibodies, etc. Virtually any therapy that would benefit by a more robust T-cell population is within the context of the methods of use described herein.

20 PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

Target cell populations, such as T-cell populations of the present invention may be administered either alone, or as a pharmaceutical composition in combination with diluents and/or with other components such as IL-2 or other cytokines or cell populations. Briefly, pharmaceutical compositions of the present invention may comprise a target cell population as described herein, in combination with one or more pharmaceutically or physiologically acceptable carriers, diluents or excipients. Such compositions may comprise buffers such as neutral buffered saline, phosphate buffered saline and the like; carbohydrates such as glucose, mannose, sucrose or dextran, mannitol; proteins; polypeptides or amino acids such as glycine; antioxidants; chelating agents such as EDTA or glutathione; adjuvants (e.g., aluminum hydroxide); and

Pharmaceutical compositions of the present invention may be administered in a manner appropriate to the disease to be treated (or prevented). The quantity and frequency of administration will be determined by such factors as the condition of the patient, and the type and severity of the patient's disease, although appropriate dosages may be determined by clinical trials.

following examples are offered by way of illustration, and not by way of limitation.

EXAMPLES

T-CELL STIMULATION

In certain experiments described herein, the process referred to as XCELLERATE™ was utilized. In brief, in this process, the XCELLERATED T-cells are manufactured from a peripheral blood mononuclear cell (PBMC) apheresis product. After collection from the patient at the clinical site, the PBMC apheresis are washed and then incubated with "uncoated" DYNABEADS® M-450 Epoxy T. During this time phagocytic cells such as monocytes ingest the beads. After the incubation, the cells and beads are processed over a MaxSep Magnetic Separator in order to remove the beads and any monocyte/phagocytic cells that are attached to the beads. Following this monocyte-depletion step, a volume containing a total of 5×10^8 CD3⁺ T-cells is taken and set-up with 1.5×10^8 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T to initiate the XCELLERATE™ process (approx. 3:1 beads to T-cells). The mixture of cells and

WO 01/62895

PCT/US81/06139

56

DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T are then incubated at 37°C, 5% CO₂ for approximately 8 days to generate XCELLERATED T-cells for a first infusion. The remaining monocyte-depleted PBMC are cryopreserved until a second or further cell product expansion (approximately 21 days later) at which time they are thawed, washed and then a volume containing a total of 5×10^8 CD3⁺ T-cells is taken and set-up with 1.5×10^9 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T to initiate the XCELLERATE Process for a second infusion. During the incubation period of ~8 days at 37°C, 5% CO₂, the CD3⁺ T-cells activate and expand. The anti-CD3 mAb (OKT3) is obtained from Ortho-Biotech, (Raritan, NJ) and the anti-CD28 mAb (9.3) is obtained from Bristol-Myers Squibb, (Stamford, Conn.).

With a modified process referred to as XCELLERATE II™ the process described above was utilized with some modifications in which no separate monocyte depletion step was utilized and in certain processes the cells were frozen prior to initial contact with beads and further concentration and stimulation were performed. (See Figures 5A and 5B). In one version of this process T-cells were obtained from the circulating blood of a donor or patient by apheresis. Components of an apheresis product typically include lymphocytes, monocytes, granulocytes, B cells, other nucleated cells (white blood cells), red blood cells, and platelets. A typical apheresis product contains $1 - 2 \times 10^{10}$ nucleated cells. The cells are washed with calcium-free, magnesium-free phosphate buffered saline to remove plasma proteins and platelets. The washing step was performed by centrifuging the cells and removing the supernatant fluid, which is then replaced by PBS. The process was accomplished using a semi-automated "flow through" centrifuge (COBE 2991 System, Baxter). The cells are maintained in a closed system as they are processed.

The cells may be further processed by depleting the non-binding cells, including monocytes, (enriched for activated cells) and then continuing with the stimulation. Alternatively, the washed cells can be frozen, stored, and processed later, which is demonstrated herein to increase robustness of proliferation as well as depleting granulocytes. In one example, to freeze the cells, a 35 ml suspension of cells is placed in a 250 ml Cryocyte freezing bag along with 35 ml of the freezing solution. The 35 ml

cell suspension typically contains 3.5×10^5 to 5.0×10^5 cells in PBS. An equal volume of freezing solution (20% DMSO and 8% human serum albumin in PBS) is added. The cells are at a final concentration of 50×10^6 cells/ml. The Cryocyte bag may contain volumes in the range of 30 - 70 ml, and the cell concentration can range from 10 to 200 $\times 10^6$ cells/ml. Once the Cryocyte bag is filled with cells and freezing solution, the bag is placed in a controlled rate freezer and the cells are frozen at $1^\circ\text{C}/\text{minute}$ down to -80°C . The frozen cells are then placed in a liquid nitrogen storage system until needed.

The cells are removed from the liquid nitrogen storage system and are thawed at 37°C . To remove DMSO, the thawed cells are then washed with calcium-free, magnesium-free PBS on the COBE 2991 System. The washed cells are then passed through an 80 micron mesh filter.

The thawed cells, approximately 0.5×10^9 $\text{CD}3^+$ cells, are placed in a plastic 1L Lifecell bag that contains 100 ml of calcium-free, magnesium-free PBS. The PBS contains 1% - 5% human serum. 1.5×10^9 $\text{CD}3 \times \text{CD}28$ beads (Dynabeads M-450) are also placed in the bag with the cells (3:1 DYNABEADS M-450 $\text{CD}3/\text{CD}28$ T: $\text{CD}3^+$ T-cells). The beads and cells are mixed at room temperature at 1 RPM (end-over-end rotation) for about 30 minutes. The bag containing the beads and cells is placed on the MaxSep Magnetic Separator (Nexell Therapeutics, Irvine, CA). Between the bag and the MaxSep, a plastic spacer (approximately 6 mm thick) is placed. (To increase the magnetic strength the spacer is removed.) The beads and any cells attached to beads are retained on the magnet while the PBS and unbound cells are pumped away.

The $\text{CD}3 \times \text{CD}28$ beads and concentrated cells bound to the beads are rinsed with cell culture media (1 liter containing X-Vivo 15, BioWhittaker; with 50 ml heat inactivated pooled human serum, 20 ml 1M HEPES, 10 ml 200 mM L-glutamine with or without about 100,000 I.U. IL-2) into a 3L Lifecell culture bag. After transferring the $\text{CD}3 \times \text{CD}28$ beads and positively selected cells into the Lifecell bag, culture media is added until the bag contains 1000 ml. The bag containing the cells is placed in an incubator (37°C and 5% CO_2) and cells are allowed to expand.

Cells are split 1 to 4 on each of days 3 and 5. T-cell activation and proliferation was measured by harvesting cells after 3 days and 8 days in culture. Activation of T-cells was assessed by measuring cell size, the level of cell surface marker expression, particularly the expression of $\text{CD}25$ and $\text{CD}134$ on day 3 of culture.

WO 01/62895

PCT/US91/06139

58

On day 8 cells are allowed to flow under gravity (approx. 150 ml/min) over the MaxSep magnet to remove the magnetic particles and the cells are washed and concentrated using the COBE device noted above and resuspended in a balanced electrolyte solution suitable for intravenous administration, such as Plasma-Lyte A® (Baxter-Healthcare).

5 As described within the specification XCELLERATE I™ refers to conditions similar to that above, except that stimulation and concentration were not performed and monocyte depletion was performed prior to stimulation.

Both XCELLERATE I™ and II™ processes were performed and T-cell proliferation was measured after 8 days in culture. The yield of expanded T-cells was greater when CD3⁺ cells were concentrated prior to cell culture. (See Table 1). In addition, the cell population had greater than 90% CD3⁺ cells.

Table 1. T-Cell Yield Expansion on at Day 8

Experiment	No CD3 ⁺ Concentration (XCELLERATE I™)	CD3 ⁺ Concentration (XCELLERATE II™)
NDa079	33 x 10 ⁹	36 x 10 ⁹
NDa081	38 x 10 ⁹	42 x 10 ⁹
NDa082	28 x 10 ⁹	38 x 10 ⁹
Average	33 ± 5 x 10 ⁹	39 ± 3 x 10 ⁹

Further experiments were performed in this regard and depict total number of expanded cells as well as the fold expansion of nine batches of cells stimulated without CD3⁺ concentration and five batches of cells stimulated with CD3⁺ concentration. (See Figures 1 and 2).

Concentration of the cells by application of a magnetic force prior to culture effectively increases the purity of the CD3⁺ cells as well as increasing CD154 levels. (Table 2, Figures 3 and 4 depict CD154 levels graphically). Furthermore, comparison of T-cell proliferation where populations of T-cells were exposed to magnets of differing strengths showed that exposure to a stronger magnet resulted in greater yield of CD3⁺ cells. (Table 2.)

Table 2. Comparison of T-Cell Proliferation and Cell Surface Markers after Concentration Using Weak and Strong Magnets

Experiment	Magnet	Day	CD3%	Size (FSC)	CD25 (MFI)	CD154 (MFI)	CD3# x 10 ⁶
NDA087							
Pre-Selection		0	47%	318	8	4	0.5
Post-Selection	Weak	0	56%				0.37
Post-Selection	Strong	0	61%				0.35
No Selection	None	3		533	758	19	
Post-Selection	Weak	3	90%	570	846	41	
Post-Selection	Strong	3	92%	558	1006	45	
Post-Culture	None						
Post-Culture	Weak	8	92%	412	110	9	17.7
Post-Culture	Strong	8	93%	413	89	7	37.8
NDA089							
Pre-Selection		0	44%	312	6	4	0.5
Post-Selection	Weak	0	46%				0.39
Post-Selection	Strong	0	53%				0.3
Post-Selection	Weak	3	83%	589	683	67	
Post-Selection	Strong	3	83%	600	720	113	
Post-Culture	Weak	8	89%	409	58	18	25.3
Post-Culture	Strong	8	87%	371	65	13	42.1

Table 2. (continued)

Experiment	Magnet	CD25 on Day 0	CD25 on Day 3	CD154 on Day 0	CD154 on Day 3	CD3 Cell # On Day 8
		(MFI)	(MFI)	(MFI)	(MFI)	$\times 10^6$
NDa087						
No Selection	None	8	758	4	19	31
Selection	Weak	8	846	4	41	18
Selection	Strong	8	1096	4	45	38
NDa089						
No Selection	None	6	309	4	12	26
Selection	Weak	6	685	4	67	25
Selection	Strong	6	720	4	115	42

Five additional experiments were performed comparing the process of XCELLERATE IP™ to that of XCELLERATE IIP™. For the cells activated and culture-
 5 expanded according to the two processes, cell activation markers (cell size, CD25 expression, and CD154 expression) on days 3 and 8 of culture are shown below in Table 3 and in Figures 6-7.

Table 3: Cell Activation Markers on Day 3

Experiment Number (Donor)	Process	Cell Size (FSC)		CD25 (MFI)		CD154 (MFI)	
		Day 0	Day 3	Day 0	Day 3	Day 0	Day 3
NDa104 (PC071)	XCELLERATE TM	282	526	7	625	5	50
	XCELLERATE TM II	315	531	7	750	5	162
NDa107 (PC074)	XCELLERATE TM	243	578	5	287	4	23
	XCELLERATE TM II	272	587	6	311	5	120
NDa110 (PC076)	XCELLERATE TM	262	588	6	497	4	59
	XCELLERATE TM II	284	615	6	580	5	197
NDa113 (PC060)	XCELLERATE TM	271	662	5	726	4	54
	XCELLERATE TM II	291	660	6	741	5	177
NDa115 (PC073)	XCELLERATE TM	253	560	6	202	6	25
	XCELLERATE TM II	252	582	6	448	6	83
Average ± Std Dev	XCELLERATE TM	262 ± 15	583 ± 50	6 ± 1	467 ± 221	5 ± 1	42 ± 17
	XCELLERATE TM II	283 ± 23	595 ± 47	6 ± 1	566 ± 189	5 ± 1	148 ± 17

All cultures in Table 3 were initiated with cells that were freeze/thawed.

- 5 The data in Table 3 and Figures 6-7 show that the XCELLERATE IITM process generated cells whose cell size and CD25 expression activation markers on day 3 were on average similar, but typically higher and continued to be higher following stimulation. However, the CD154 activation marker on day 3 for T-cells from the XCELLERATE IITM process was much greater than for those of T-cells from the
- 10 XCELLERATE ITM process. Further, as demonstrated above, the XCELLERATE IITM process generated CD25 and CD154 levels that were consistently higher per donor than other methods.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

62

The expression of CD154 on Day 3 of the XCELLERATE II™ process is actually much higher than for XCELLERATE I™. This observation suggests that the T-cells are in a higher state of activation during the XCELLERATE II™ process than in the XCELLERATE I™ process. It is predicted that this may translate into a more effective product when administered *in vivo*.

CD3⁺ Cell Purity, CD4 Cell/CD8 cell ratio, and cell viability on Day 3 of culture were also determined for five patient samples. The phenotype and viability of cells used subjected to the XCELLERATE I™ process and the XCELLERATE II™ process are shown below in Table 4 as measured by Flow Cytometry or Trypan blue staining.

WO 01/62095

PCT/US01/06139

63

Table 4

NDA #	Day 0 CD3 ⁺ Cell Purity (%)	Day 0 Cell Viability (%)	Day 0 CD4:CD8 ratio ^W	Day 3 CD3 ⁺ Cell Purity (%)	Day 3 Cell Viability (%)	Day 3 CD4:CD8 ratio
103 XCELLERATE I	70	92	1.91	79	82	1.3
105 XCELLERATE II	85	99	2.3	91	95	2.4
106 XCELLERATE I	87	95	3.2	84	78	2.7
104 XCELLERATE II	110	99	3.7	93	87	2.9
107 XCELLERATE I	69	99	2.3	85	85	2.3
107 XCELLERATE II	119	99	2.7	95	92	2.8
110 XCELLERATE I	63	99	2.9	91	82	2.6
110 XCELLERATE II	83	99	3.9	93	92	4.5
113 XCELLERATE I	68	99	1.9	92	91	2.7
115 XCELLERATE II	72	99	2.2	96	94	2.8

- 5 ^W = ratio of CD4⁺: CD8⁺ T-cells on day 0 after monocyte-depletion in the XCELLERATE I process or after magnetic concentration in the XCELLERATE II process

EXAMPLE II

EFFICIENCY OF CD3⁺ T-CELL ENRICHMENT, MONOCYTE-DEPLETION
AND GRANULOCYTE-DEPLETION

10

For this study, upon receipt at the Xcyte Therapies Development laboratory, the incoming PBMC apheresis product was washed, split and:

1. For the XCELLERATE I process, a monocyte-depletion step was carried out and the CD14⁺ monocyte-depleted PBMC were cryopreserved and stored in the vapor phase of a LN₂ freezer (as noted in Example I). On the day of set-up of the XCELLERATE I process, the CD14⁺ monocyte-depleted PBMC were thawed and the
5 XCELLERATE process initiated with DYNABEADS M-450 CD3/CD28 T as detailed in Example I. The average cellular composition and the average efficiency of CD3⁺ T-cell enrichment, CD14⁺ monocyte-depletion and granulocyte-depletion for the N=5 donors in these initial steps is shown in Table 5.1 and the data for each individual donor is shown in Table 5.2.
 - 10 2. For the XCELLERATE II process, the PBMC apheresis product cells cryopreserved and stored in the vapor phase of a LN₂ freezer. On the day of set-up of the XCELLERATE II process, the cryopreserved PBMC apheresis product cells were thawed and the CD3⁺ T-cells magnetically concentrated and the XCELLERATE II process initiated with DYNABEADS M-450 CD3/CD28 T as detailed in Example I.
15 The average cellular composition and the average efficiency of CD3⁺ T-cell enrichment, CD14⁺ monocyte-depletion and granulocyte-depletion for the N=5 donors in these initial steps is shown in Table 5.1 and the data for each individual donor is shown in Table 5.2.
- As demonstrated in Tables 5.1 and 5.2, the combination of freeze/thawing
20 of the PBMC apheresis product followed by magnetic concentration of CD3⁺ T-cells direct from the thawed PBMC apheresis product in the XCELLERATE II process configuration results in efficient elimination of CD14⁺ monocytes and granulocytes (Table 5.1 and Table 5.2). The efficiency of the elimination of the CD14⁺ monocytes and the granulocytes in the XCELLERATE II process is as good as that of the
25 XCELLERATE I process with the benefit that it eliminates the need for a separate depletion step using the additional "uncoated" DYNABEADS M-450 T reagent and consistently leads to a higher CD4/CD8 ratio.

Table 5.1: Average (N = 5) efficiency of CD3⁺ T-cell enrichment, CD14⁺ monocyte-depletion and granulocyte-depletion in the initial steps of the XCELLERATE I and the XCELLERATE II Process Configurations

Cell Preparation	Average ± Std. Dev Cellular Composition (%)			
	CD3 ⁺	CD14 ⁺	Granulocytes	CD4/CD8 ⁺
Incoming PBMC apheresis product	49 ± 6	16 ± 3	8 ± 7	2.2 ± 0.3
XCELLERATE I				
Monocyte-depleted PBMC	51 ± 6	5.5 ± 3	5.7 ± 5	2.4 ± 0.6
Freeze/thawed Monocyte-depleted PBMC	64 ± 4	6 ± 3	0.4 ± 0.5	2.4 ± 0.6
XCELLERATE II				
Freeze-thawed PBMC apheresis product	56 ± 5	11 ± 2	0.4 ± 0.5	2.4 ± 0.8
Post-CD3 ⁺ magnetic concentration	92 ± 22	2.4 ± 3.7	0 ± 0	2.86 ± 0.86

Cellular compositions were determined by flow cytometry according to standard protocols.

Table 5.2: Comparison of the efficiency of CD3⁺ T-cell enrichment, CD14⁺ monocyte-depletion and granulocyte-depletion in the initial steps of the XCELLERATE I and the XCELLERATE II process configurations

Experiment Number (Donor)	Cell Preparation	Cellular Composition (%)			
		CD3 ⁺	CD14 ⁺	Granulocytes	CD4/CD8 ^a
NDat104 (PC071)	Increasing PBMC apheresis product	43%	11%	14%	2.2
	XCELLERATE I				
	Monocyte-depleted PBMC	54%	5%	12.5%	3.2
	Freeze/thawed Monocyte-depleted PBMC	67%	4%	9%	3.2
	XCELLERATE II				
	Freeze-thawed PBMC apheresis product	54%	7%	0%	3.1
NDat107 (PC074)	Post-CD3 ⁺ magnetic concentration	110%	1%	0%	3.7
	Increasing PBMC apheresis product	51%	16%	1%	2.1
	XCELLERATE I				
	Monocyte-depleted PBMC	64%	5%	1%	2.3
	Freeze/thawed Monocyte-depleted PBMC	69%	3%	0%	2.3
	XCELLERATE II				
NDat110 (PC076)	Freeze-thawed PBMC apheresis product	55%	11%	0%	2.0
	Post-CD3 ⁺ magnetic concentration	120%	0%	0%	2.7
	Increasing PBMC apheresis product	44%	18%	15%	2.5
	XCELLERATE I				
	Monocyte-depleted PBMC	63%	3.5%	10%	2.9
	Freeze/thawed Monocyte-depleted PBMC	63%	7%	0%	2.9
NDat113 (PC060)	XCELLERATE II				
	Freeze-thawed PBMC apheresis product	55%	13%	0%	3.2
	Post-CD3 ⁺ magnetic concentration	83%	1%	0%	3.8
	Increasing PBMC apheresis product	47%	17%	6%	2.3
	XCELLERATE I				
	Monocyte-depleted PBMC	61%	4%	3%	1.8
NDat115 (PC073)	Freeze/thawed Monocyte-depleted PBMC	63%	4%	1%	1.8
	XCELLERATE II				
	Freeze-thawed PBMC apheresis product	51%	13%	1%	1.5
	Post-CD3 ⁺ magnetic concentration	76%	1%	0%	1.9
	Increasing PBMC apheresis product	59%	17%	2%	1.7
	XCELLERATE I				
NDat115 (PC073)	Monocyte-depleted PBMC	60%	10%	2%	1.8
	Freeze/thawed Monocyte-depleted PBMC	60%	11%	1%	1.9
	XCELLERATE II				
	Freeze-thawed PBMC apheresis product	59%	12%	1%	2.0
	Post-CD3 ⁺ magnetic concentration	72%	0%	0%	2.2

^a Cellular composition was determined by flow cytometry according to standard protocols.

5

In addition to the simplification and streamlining of the process by elimination of the CD14⁺ monocyte-depletion step and the associated reagents, the magnetic concentration step in the XCELLERATE IITM process also provides a higher

purity of CD3⁺ T-cells and a higher ratio of CD3⁺ CD4⁺ : CD3⁺ CD8⁺ T-cells at the initiation of T-cell activation (Table 5.1 and Table 5.2).

Yield, Purity, Viability and Composition of Activated CD3⁺ T-cells Pre-harvest on Day 8 of the XCELLERATE ITM process and the XCELLERATE IITM process were also compared.

As shown in Table 5.3, the average yield, purity and viability of the CD3⁺ T-cells prior to harvest on day 8 are typically improved for the XCELLERATE IITM compared to the XCELLERATE ITM process.

Table 5.3: Yield, purity, viability and composition of activated CD3⁺ T-cells pre-harvest on day 8 of the XCELLERATE I process and the XCELLERATE II process

Experiment Number (Donor)	XCELLERATE Process Configuration	Pre-harvest CD3 ⁺ T-cell Product Properties			
		# CD3 ⁺ T-cells	Purity CD3 ⁺ T-cells (%)	Viability (%)	CD4/CD8 Ratio*
NDa104 (PC071)	XCELLERATE I	65 x 10 ⁶	95	97	1.2
	XCELLERATE II	50 x 10 ⁶	97	97	1.7
NDa107 (PC074)	XCELLERATE I	57 x 10 ⁶	98	98	0.8
	XCELLERATE II	52 x 10 ⁶	98	98	1.3
NDa110 (PC076)	XCELLERATE I	41 x 10 ⁶	96	95	1.6
	XCELLERATE II	41 x 10 ⁶	99	99	2.4
NDa113 (PC060)	XCELLERATE I	41 x 10 ⁶	96	96	1.3
	XCELLERATE II	43 x 10 ⁶	98	98	2.0
NDa115 (PC073)	XCELLERATE I	31 x 10 ⁶	96	96	1.3
	XCELLERATE II	48 x 10 ⁶	97	97	1.4
Average ± Std Dev	XCELLERATE I	47 ± 14	96 ± 2	97 ± 1	1.2 ± 0.3
	XCELLERATE II	45 ± 6	98 ± 1	98 ± 1	1.8 ± 0.4

* Ratio of CD3⁺ CD4⁺ : CD3⁺ CD8⁺ T-cells.

Also, as shown in Table 5.3, the XCELLERATE IITM process maintains a higher ratio of CD3⁺ CD4⁺ : CD3⁺ CD8⁺ T-cells throughout the process. This may be

WO 01/62893

PCT/US01/06139

68

due to preferential concentration of CD3⁺ CD4⁺ cells during the magnetic concentration step (Tables 5.1 and 5.2).

"Incoming" refers to fresh, washed incoming apheresis cells. The starting cells listed in Table 5.2 for the XCELLERATE ITM process were apheresis cells that had been washed, monocyte depleted, and/or frozen/thawed. The starting cells listed in Table 5.2 for the XCELLERATE IITM process were apheresis cells that had been washed and frozen/thawed.

* = Ratio of CD3⁺ CD4⁺ : CD3⁺ CD8⁺ T-cells

Table 5.3 shows that the XCELLERATE IITM process resulted in a cell product that was more pure (in terms of %CD3⁺ cells) than the cell product from the XCELLERATE ITM process. That is, the product cells from the XCELLERATE IITM process had an average (\pm std dev) CD3⁺ cell purity of 96% \pm 1% while the cells from the XCELLERATE ITM process had an average purity of 93% \pm 2%.

Also, as shown in Table 5.3, the XCELLERATE IITM process maintained a higher ratio of CD4/CD8 cells. The incoming cells had an average CD4/CD8 cell ratio of 2.2 and the product cells from the XCELLERATE IITM process had a CD4/CD8 ratio of 1.8, while the product cells from the XCELLERATE ITM process had a CD4/CD8 ratio of 1.2.

The data of Table 5.3 also shows that the XCELLERATE IITM process resulted in product cells with an average viability of 98% while the XCELLERATE ITM process resulted in product cells with an average viability of 97%.

EXAMPLE III

MONOCYTE DEPLETION

Monocytes (CD14⁺ phagocytic cells) are removed from T-cell preparations via magnetic depletion using a variety of "irrelevant" (*i.e.*, non-antibody coated or non-target antibody coated) Dynal beads. Depletion was performed by pre-incubating either whole blood after separation in ficoll or apheresed peripheral blood

WO 01/62895

PCT/US01/06139

69

with Dynal Sheep anti-mouse M-450 beads, or Dynal human serum albumin-coated beads (M-450), or with Dynal Epoxy (M-450) beads at roughly a 2:1 bead to cell ratio. The cells and beads were incubated for periods of 1-2 hours at 22-37 degrees C, followed by magnetic removal of cells that had attached to beads or that had engulfed beads. The remaining cells were placed into culture alongside un-manipulated cells. Cells were characterized by flow cytometry for cell phenotype before and after depletion.

EXAMPLE IV

FLOW CYTOMETRY SETTINGS

10 A Becton Dickinson FACSCALIBUR cytometer was used for all the data collected and presented. Any flow cytometer capable of performing 3-color analysis could be used by an experienced operator to acquire identical data. For example, a FACSCAN, Vantage Cell Sorter, or other BD product would work to collect similar data. Also, Coulter products, such as the Coulter Epic Sorter would work as well.

15 The instrument setting given below can be used as a general guideline for instrument conformation to gather data as was done in these studies. These settings were used for the Examples provided herein; however, modifications to these settings can and should be made by an experienced instrument handler to adjust appropriately for compensation and detector voltages. Also, the use of different detection antibodies with different fluorescent tags requires unique adjustment to any particular instrument to give optimal signal separation (voltage) with minimal "bleeding-over" into other channels (e.g., compensation). A skilled flow operator, well-versed in using compensation controls, isotype controls, and with a general understanding of T-cell biology should be able to reproduce any of the data presented below.

25 Further it should be noted that various settings, particularly voltage settings, may vary, depending upon the efficiency of the instrument laser. For example, older lasers may require more voltage to generate a signal comparable to a newer laser. However, the data obtained, whether with more or less voltage, should reflect similar patterns in biology.

30

WO 01/62895

PCT/US01/06139

70

Settings used on the FACSCALIBUR™ (Becton Dickinson):

Detector/Amps:

Parameter	Detector	Voltage	Amp/Gain	Mode
5 P1	FSC	800	1.30	Lin
P2	SSC	370	1.00	Lin
P3	FL1	610	1.00	Log
P4	FL2	550	1.00	Log
10 P5	FL3	520	1.00	Log

Although the parameter voltages are generally constant, P3, P4, and P5 may be adjusted slightly up or down in order to achieve maximum signal separation, while maintaining a negative control signal value in or near the first decade (0-10) in signal strength in the log mode.

15

Threshold:

Primary parameter: FSC (forward scatter)

Value: 52

20 Secondary parameter: none

Compensation:

FL1 - 4.0% FL2

FL2 - 21.4% FL1

25 FL2 - 2.6% FL3

FL3 - 15.2% FL2

While the settings provided approximate the settings used to collect most of the data presented below, the settings may be altered and roughly equivalent data on stimulated T-cells should be generated. The general acceptable ranges for compensation at the voltages listed above are as shown below:

30

WO 01/62895

PCT/US01/06139

71

	FL1-FL2	0.4-4%
	FL2-FL1	18-27%
	FL2-FL3	2-8%
5	FL3-FL2	10-16%

The determination of the particular compensation or voltage values has to be made by an experienced flow cytometer operator with the following goals:

- 1) Voltage: Maximization of signal separation between positive and negative signals (e.g., surface antigen marker negative vs. low levels surface antigen vs. high levels surface antigen).
- 2) Compensation: Minimization of interchannel interference (bleed-over) by use of compensation controls.

15 As voltage settings change, so do compensation settings.

EXAMPLE V

CELL PROLIFERATION AND VIABILITY ASSAYS

Cell proliferation and viability was measured by standard Trypan Blue staining and cell counting using a hemocytometer. See Figures 5A-5E.

EXAMPLE VI

ACTIVATION MARKER ASSAYS

25 CD154 is expressed on activated T-cells in a temporal manner and has been shown to be a key element in T-cells interactions via CD40 on APCs. Blocking the interaction of these two receptors can effectively alter, and even shut-off, an immune response. Aliquots of T-cells that were stimulated by concentration with CD3xCD28 paramagnetic beads were removed from cell culture at days 3, 5, and 8 and analyzed for the level of CD154 expression. The level of CD154 expression was

compared with T-cells that were depleted of monocytes but were not incubated with CD3xCD28 paramagnetic beads (that is, the T-cells were not magnetically concentrated at culture initiation). Significant activation of the T-cells stimulated by magnetic concentration with anti-CD3 and anti-CD28 beads was shown by a three-fold increase in the level of CD154 expression on the third day of culture compared with cells that were not similarly stimulated at culture initiation. (See Figures 4 and 7). CD25 levels measured in a similar manner (Figure 6) show a trend toward higher activation.

In general, marker expression was monitored over various times. In this regard cells are labeled with anti-human CD4 (Immunotech, Fullerton, CA), FITC coupled anti-human CD11a (Pharmingen), FITC coupled anti-human CD26 (Pharmingen), FITC coupled anti-human CD49d (Coulter), FITC coupled anti-human CD54 (Pharmingen and Becton Dickinson), FITC coupled anti-human CD95 (Pharmingen), FITC coupled anti-human CD134 (Pharmingen), FITC coupled anti-human CD25 Ab (Becton Dickinson, Fullerton, CA), FITC coupled anti-human CD69 Ab (Becton Dickinson), FITC or PE coupled anti-human CD154 Ab (Becton Dickinson), or FITC or PE coupled IgG1 isotype control Ab. Cells, 2×10^5 are labeled for 20 minutes at 4°C with 2 μ l of each antibody in a final volume of 30 μ l, washed and resuspended in 1% paraformaldehyde (Sigma, St. Louis, MO).

Comparison of cell surface marker molecule expression levels may be carried out by a variety of methods and thus absolute values may differ. However, when comparing two values the relative fold values may be readily calculated. For example, CD154 expression levels on T-cells generated by different "activation" methods can be measured with relative accuracy by flow cytometric means. Using a reagent, such as Becton Dickinson's anti-CD154 -PE conjugate (catalogue # 340477), one can stain T-cells in resting or activated states and gauge expression levels for this marker (or others by means well known to experienced flow cytometer operators. Described herein are methods which provide for increased expression of CD154 on T-cells, both CD4⁺ and CD8⁺. By simultaneously stimulating and concentrating T-cells at the initiation of culture, as described herein, expression levels can be driven up beyond values obtained by standard 3x28 activation, on the order of a 20% to over a 100%

WO 01/63895

PCT/US01/06139

73

increase in levels, as measured by mean fluorescent intensity (MFI) using flow cytometry (BD FACSCalibur and antibody described above). For example, an unstimulated CD4⁺ T-cell would be negative for CD154 and would therefore yield MFI values between 1-10. Upon activation by XCELLERATE IITM, at 3 days post-activation, MFI values for CD154 on CD4⁺ T-cells might be in the 20-40 range, while the XCELLERATE IITM process might yield CD154 MFI values of 60-200. While these are not absolute values in terms of the number of CD154 molecules expressed on T-cells, there are sufficient to determine relative levels of increased expression. Accordingly, it can be demonstrated that an approximate 1.1 to 20 fold increase in CD154 levels between 1-4 days, post-activation can be demonstrated with the XCELLERATE IITM process as compared to the XCELLERATE ITM process.

EXAMPLE VII

CYTOKINE ASSAYS

Cells are prepared as described above. Supernatants from cells stimulated for various times are subjected to an IL-2, IL-4, INF-gamma or TNF- α ELISA according to the manufacturer's instructions (Biosource International, Sunnyvale, CA).

In an alternative assay, IL-2 is measured by intracellular staining of CD4 T-cells using flow cytometry. For intracellular labeling of IL-2 or IFN- γ , cells are first incubated with 1 μ g/ml Monensin (Calbiochem) for 4 hours prior to assay. The cells are subsequently stained for surface proteins as described above, fixed and permeabilized using Becton Dickinson intracellular staining-kit, labeled with PE-coupled anti-human IL-2 Ab and FITC coupled anti-human IFN- γ or the corresponding control Abs as described by the manufacturer. Data acquisition and flow cytometric analysis is performed on a Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer using Cellquest software following the manufacturer's protocol (Becton Dickinson).

IFN-gamma concentrations were about 2, 3, 4, and in some cases 5 fold higher at day 3 when using the XCELLERATE II™ methodology as opposed to XCELLERATE I™ (data not shown). Further, TNF-alpha levels were also markedly higher (between 1.5 to 3 fold higher) up to day 5 following stimulation (data not shown) as compared with XCELLERATE I™.

EXAMPLE VIII

PHENOTYPICAL CELL ANALYSIS AFTER RESTIMULATION

For restimulation analysis about 5×10^6 cells are taken from the culture at the day of termination. In several examples, the date of termination is day 8 of culture. The cells are placed into 5 mL of X-vivo 15 media with serum and with or without IL-2 as indicated above, in one well of a six well plate. About 5×10^6 Dynabeads M-450 CD3/CD28 T beads to the well containing the cells and the cells and beads are placed in a 37 C, 5% CO₂ incubator. After two days, the samples are removed and tested for viability and analyzed by FACS to determine cell size, and cell marker and/or cytokine expression levels, such as CD25 expression levels, CD154 expression levels. Table 6 demonstrates these results below for five patient samples subject to the XCELLERATE I™ and the XCELLERATE II™ process.

Table 6: Results of the Re-stimulation Assay for XCELLERATED T-cells Produced Using the XCELLERATE I™ and the XCELLERATE II™ Processes

Experiment Number (Donor)	Process Configuration	Cell Size (FSC)		CD25 (MFI)		CD154 (MFI)	
		T = 0	T = 48 hr	T = 0	T = 48 hr	T = 0	T = 48 hr
NDa104 (PC071)	XCELLERATE I	393	607	104	478	6	37
	XCELLERATE II	404	659	115	544	12	70
NDa107 (PC074)	XCELLERATE I	386	596	59	585	6	121

WO 01/62895

PCT/US01/06139

75

	XCELLERATE II	380	607	62	721	10	109
NDa110 (PC076)	XCELLERATE I	425	301	111	600	10	39
	XCELLERATE II	390	445	97	434	15	36
NDa113 (PC060)	XCELLERATE I	399	630	66	659	8	32
	XCELLERATE II	411	633	113	816	12	145
NDa115 (PC073)	XCELLERATE I	433	514	105	247	13	10
	XCELLERATE II	408	569	81	369	20	36
Average ± Std Dev (n = 5)	XCELLERATE I	407 ± 21	570 ± 58	89 ± 24	514 ± 163	9 ± 3	48 ± 43
	XCELLERATE II	399 ± 13	583 ± 84	94 ± 22	577 ± 189	14 ± 4	79 ± 48

EXAMPLE IX

5 ALTERNATIVE CELL COLLECTION AND CULTURE PROTOCOLS

XCELLERATE™

- Cells isolated from human blood are grown in X-vivo media (Biowhitaker Inc., Walkersville, MD) and depending on use supplemented with or without 20 U/ml IL-2 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) and supplemented with 5% human serum (Biowhitaker), 2 mM Glutamine (Life Technologies, Rockville, MD) and 20 mM HEPES (Life Technology). Jurkat E6-1 cells (ATCC, Manassas, VA) are grown in RPMI 1640 (Life Technologies) supplemented with 10% FBS (Biowhitaker), 2 mM glutamine (Life Technologies), 2 mM Penicillin (Life Technologies), and 2 mM Streptomycin (Life Technologies).

Buffy coats from healthy human volunteer donors are obtained (American Red Cross, Portland, OR). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are obtained using Lymphocyte Separation Media (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) according to the manufacturers' instructions.

- 5 Peripheral blood lymphocytes (PBL) are obtained from the PBMC fraction by incubation in culture flask (Costar, Pittsburgh, PA) with uncoated Dynabeads (Dyna, Oslo, Norway), 10^8 cells/ml, 2 beads/cell, 2h at 37°C . Monocytes and macrophages can be removed by adherence to the culture flask. Alternatively, they can be removed by phagocytosing the paramagnetic beads and then depleting these cells
- 10 by magnetic cell separation according to the manufacture's instruction (Dyna). CD4^+ cells are purified from the PBL fraction by incubation with $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ of monoclonal antibodies against CD8 (clone G10-1), CD20 (clone IF5), CD14 (clone F13) and CD16 (Coulter), 10^8 cells/ml, 20 min at 4°C . After washing, cells are treated with sheep anti-mouse Ig-coupled Dynabeads (10^8 cells/ml, 6 beads/cell, 20 min at 4°C) and then
- 15 depleted twice via magnetic cell separation. The purity of CD4^+ cells are routinely 91-95% as measured by Flow cytometry.

- Dendritic cells are generated by first adhering PBMC to a culture flask (Costar), 10^8 cells/ml, 2h at 37°C (without Dynabeads). After extensive washing, adherent cells are cultured for 7 days in media containing 500 U/ml GM-CSF
- 20 (Boehringer Mannheim) and 12.5 U/ml IL-4 (Boehringer Mannheim). The resulting cell population is weakly adherent and expresses surface markers characteristic of dendritic cells (e.g., expresses HLA-DR, CD86, CD83, CD11c and lacks expression of CD4). (All antibodies obtained from Becton Dickinson, San Jose, CA).

- Other techniques can utilize human peripheral blood lymphocytes
- 25 containing T-cells that are incubated in tissue culture plates and/or tissue culture flasks (Duxor bags), or other common culture vessels in media, which could be composed of RPMI, X-Vivo 15, or some other T-cell culture media. Although not required for the activation and growth of T-cells, glutamine and HEPES are added to the culture media. Fetal bovine serum (10% final), human A/B serum (5%), or autologous human serum
- 30 (5%) is added to culture media. The percentage of serum may vary without greatly

WI 01/62895

PCT/US01/06139

77

affecting T-cell biology or culture outcome. In some instances, recombinant human IL-2 is added to cultures. In some instances, phagocytic CD14⁺ cells and other phagocytic cells are removed by magnetic depletion as described, *infra*. Beads having co-immobilized upon their surface anti-CD3 and anti-CD28 (3x28 beads) are added at a 3:1 bead:cell ratio. Cultures are maintained at 37 degrees C at 5-7% CO₂. Cells are removed at several timepoints over a 14 day period to determine cell density (cell number), cell size, and cell surface phenotype as measured via flow cytometric analysis of a variety of surface antigens. Supernatants are also collected from cultures to determine cytokine secretion profiles, including, but not limited to: IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α . As activated cells grow and divide, cultures are maintained at $0.2-2 \times 10^6$ CD3⁺ T-cells/ml. When T-cell density exceeds roughly 1.5×10^6 /ml, cultures are split and fed with fresh media so as to give a cell density in the $0.2-1.4 \times 10^6$ /ml range. At roughly 2 hours to about 14 days following initial stimulation, when activated T-cells are shown to be entering a more quiescent phase (e.g., CD25 levels diminishing, cell size as determined by forward scatter is diminishing, rate of cell division may be reduced), cells are either infused into the subject or re-stimulated with one of the following stimuli:

- 1) No stimulus
- 2) Phytohemagglutinin (PHA) 2 μ g/ml
- 3) (3x28 beads) at a 1:1 bead/cell ratio

Cells are again analyzed over time for cell phenotype and activation/functional state. Supernatants are again collected for secreted cytokine analysis.

- 25 Cells were stimulated by three different methodologies 1) Dynabeads (M-450) covalently coupled to anti-CD3 (OKT-3) and anti-CD28 (9.3) antibodies (3x28 beads) according to the manufacturer's instructions (Dyna), 3 beads/cell, 2) Ionomycin (Calbiochem, La Jolla, CA) (100 ng/ml) and phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) (Calbiochem) (10 ng/ml), 3) allogeneic dendritic cells (25,000 dendritic cells/200,000 CD4 cells). All cells are stimulated at a concentration of 10^6 cell/ml. Proliferation

WO 01/62895

PCT/US81/06139

78

assays are conducted in quadruplicate in 96 well flat-bottom plates. Cells are stimulated at 10^6 cells/ml in a final volume of 200 μ l. Proliferation is measured by MTT assay (MTT assay kit, Chemicon International Inc., Temecula, CA) at day 3 (stimulation method 1 and 2) or at day 6 (stimulation method 3), and results are presented as mean value of quadruplicates. PBL cultures or purified CD4⁺ cell cultures are stimulated with 3x28 beads, ionomycin/PMA, or allogenic dendritic cells.

As demonstrated by Figures 8A-8B, cell numbers (Coulter counter) increase dramatically following stimulation with PHA, 3x28 beads (anti-CD3 and anti-CD28 co-immobilized on beads) attached to the beads via sheep anti-mouse (SAM), 3x28 beads with the antibodies covalently attached to the beads, or antibodies singly or dually immobilized on a plate. Figure 9 also demonstrates increases in cell numbers following stimulation with covalently immobilized anti-CD3 and anti-CD28 on beads +/- monocyte depletion and +/- 20 units of IL-2.

15

EXAMPLE X

MONOCYTE DEPLETION VIA MAGNETIC DEPLETION

Monocytes (CD14⁺ phagocytic cells) are removed from T-cell preparations via magnetic depletion using a variety of "irrelevant" (i.e., non-antibody coated or non-target antibody coated) Dynal beads. Depletion was performed by pre-incubating ficoll whole blood, or apheresed peripheral blood with roughly 2:1 bead to cell ratio of Dynal Sheep anti-mouse M-450 beads, or Dynal human serum albumin-coated beads (M-450), or with Dynal Epoxy (M-450) beads for periods of 1-2 hours at 22-37 degrees C, followed by magnetic removal of cells which had attached to beads or engulfed beads. The remaining cells were placed into culture alongside un-manipulated cells. Cells were characterized by flow cytometry for cell phenotype before and after depletion. Figure 9 demonstrates increased proliferation in the absence of monocytes.

30

WO 01/62895

PCT/US01/06139

79

EXAMPLE XI

PRE-ACTIVATION AND POST-ACTIVATION KINETIC TIMECOURSE STUDIES

5

A series of experiments were performed in which human T-cells, isolated either from whole blood or from apheresed peripheral blood, were cultured under a variety of conditions. Those conditions include:

10

- 1) No stimulation
- 2) Stimulation with phytohemagglutinin (PHA) at 2 µg/ml.
- 3) Stimulation with 3x28 Dynabeads (beads having anti-CD3 and anti-CD28 beads conjugated thereto) at 3:1 or 1:1 bead-to-T-cell ratio.
- 15 4) Stimulation or culture in the presence or absence of exogenously added recombinant human IL-2 at 10 U/ml (5 ng/ml).
- 5) Culture in the presence of monocytes (CD14⁺ phagocytic cells) or cultured following removal of aforementioned cells via magnetic depletion using a variety of "irrelevant" Dynabeads. Depletion was performed as illustrated in Example 2.

20

The following cell surface markers were analyzed by flow cytometry to determine cell phenotype and activation state: CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD25, CD45RA, CD45RO, CD54, CD62L, CDw137 (41BB), CD154. Cell size is also examined, as determined by forward scatter profiles via flow cytometry.

25

Markers, such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD45RA, and CD45RO are used to determine T, B, and monocyte lineages and subpopulations, while forward scatter, CD25, CD62L, CD54, CD137, CD154 are used to determine activation state and functional properties of cells.

30

Human peripheral blood lymphocytes containing T-cells were prepared as described in Example IX. Cells are analyzed over time for cell phenotype and

WO 01/62895

PCT/US91/06139

80

activation/functional state. Supernatants are collected for secreted cytokine analysis. Figures 8 and 9 demonstrates general growth characteristics of human T-cells following activation with 3x28 beads +/- recombinant human IL-2 at 100u/ml and +/- monocyte depletion. All cells were cultured in Baxter Lifecell Flasks (300ml). The one plot labeled "Scale up" refers to a 300ml flask culture (No IL-2/Monocyte depleted) that was expanded up to a Baxter Lifecell 3 liter flask. The graph demonstrates an approximate 2-4 log expansion of human T-cells under the various conditions.

Figure 10 shows the kinetic analysis of cell size as determined by forward scatter flow cytometry profiles over time. T-cell are seen to increase in size shortly after activation and subsequently decrease in size so that by day 14 they demonstrate smaller forward scatter profiles, indicating a more quiescent state.

Figure 11 shows IL-2 receptor (CD25) expression over time following 3x28 bead stimulation. Both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells show an early increase in receptor level. By day 14, CD25 expression levels are greatly reduced on a majority of T-cells, indicating a more quiescent state.

When 3x28-stimulated T-cells became more quiescent (low CD25, low forward scatter), they were re-stimulated as shown below:

- 1) No stimulation
- 2) PHA 2ug/ml
- 3) 3x28 (Xcellerate) bead stimulation at 1 bead/CD3⁺ T-cell

A kinetic analysis of cell size (forward scatter), surface phenotype, activation marker expression, and cytokine secretion was then performed. Figure 12 shows forward scatter (cell size) kinetics following primary and secondary stimulation. Figure 13 shows CD25 (IL-2-Receptor) expression kinetics following primary and secondary stimulation. Figure 16 shows CD54 (I-CAM) expression following secondary stimulation, on CD4⁺ T-cells (A) and on CD8⁺ T-cells (B), where the primary stimulation was either PHA or CD3xCD28 beads, and re-stimulation was

WO 01/62895

PCT/US81/06139

81

either: none, PHA, or 3x28 beads. Markers delineating between CD4 and CD8 positive cells were also used to determine their relative proportion during 3x28 antibody bead activation (Figures 19 and 22).

5

EXAMPLE XII
ANALYSIS OF CYTOKINE EXPRESSION PATTERNS
OF CO-STIMULATED T-CELLS

The role of a variety of cytokines, including IL-2, IFN- γ , TNF- α , and IL-4 have been extensively studied as they relate to T-cell maintenance, expansion, and differentiation. Notably, IL-2 has been shown to be supportive of T-cell maintenance and expansion. IFN- γ has been implicated in driving T-cells to differentiate into TH1-type immune responder, while IL-4 has been implicated for driving T-cells to TH2-type responses. Cytokine release levels in primary human T-cells activated by either PHA or CD3xCD28 beads were analyzed by stimulating T-cells as in Example IX, including kinetic studies of responses to primary stimulation and responses to a secondary stimulus. The data are shown in Figures 18A-C and Figures 23-24 demonstrate a unique feature of CD3xCD28 bead stimulation. Between day 2 and day 4 following initial stimulation (day one was not assessed), extremely high levels of both IL-2 and IFN- γ were observed. A nearly 5-fold increase in absolute secreted IL-2 levels was seen for 3x28 bead-stimulated T-cells as compared to levels observed for cells stimulated with PHA. An approximate 7-fold increase in IFN- γ levels was also observed: in 3x28 stimulated T-cells as compared to their PHA counterparts. In the case of IL-4, the increase was not as dramatic for primary stimulation. Interestingly, and of possibly great significance, is that after cells became quiescent (no longer dividing or secreting the three cytokines mentioned above) following primary stimulation, they were re-stimulated with either CD3xCD28 beads, PHA, or left un-stimulated. T-cells which had received an initial activation/expansion signal through CD3xCD28 beads secreted even higher levels of IFN- γ than observed following primary stimulation. In contrast, cells that were initially stimulated with PHA secreted IFN- γ levels much lower than seen for their 3x28 counterparts. Similar difference were also observed for IL-4 levels.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

82

These data suggest that cells obtained following activation/expansion mediated through CD3xCD28 beads are functionally different than those obtained from other means of expansion, such as PHA. The resultant cells appear to have an altered cytokine secretion response, one that promotes very high levels of both T_{H1} and T_{H2} cytokines, with a possible favoring of the T_{H1} -type profile (IFN- γ). Secretion of such high levels of these cytokines in culture can have many effects, including: driving T-cells into a T_{H1} differentiation pathway, which is one that favors anti-tumor and anti-viral responses; and also by altering the basic functionality of resultant T-cells (such as lowering threshold of activation and inhibiting programmed cell death pathways).

10

EXAMPLE XIII

ANALYSIS OF CD54 EXPRESSION OF CO-STIMULATED T-CELLS

Figure 16 shows CD54 (I-CAM) expression following secondary stimulation, on CD4⁺ T-cells (A) and on CD8⁺ T-cells (B), where the primary stimulation was either PHA or CD3xCD28 beads, and re-stimulation was either: none, PHA, or 3x28 beads.

20

EXAMPLE XIV

SHORT TERM ACTIVATION MARKER ASSAYS

Marker expression was monitored over various times following stimulation of T-cells as set forth in Example IX. In this regard cells are labeled with anti-human CD4 (Immunotech, Fullerton, CA), FITC-coupled anti-human CD11a (Pharmingen), FITC-coupled anti-human CD26 (Pharmingen), FITC-coupled anti-human CD49d (Coulter), FITC-coupled anti-human CD54 (Pharmingen and Becton Dickinson), FITC-coupled anti-human CD95 (Pharmingen), FITC-coupled anti-human CD134 (Pharmingen), FITC-coupled anti-human CD25 Ab (Becton Dickinson, Fullerton, CA), FITC-coupled anti-human CD69 Ab (Becton Dickinson), FITC- or PE-

30

WO 01/62895

PCT/US81/06139

83

coupled anti-human CD154 Ab (Becton Dickinson), or FITC-or PE-coupled IgG1 isotype control Ab. Cells, 2×10^5 are labeled for 20 minutes at 4°C with 2 μ l of each antibody in a final volume of 30 μ l, washed and resuspended in 1% paraformaldehyde (Sigma, St. Louis, MO). See Figures 21-22, and 26A-26L, as is demonstrated by these
5 figures there appear significant differences over activation time as well as between CD4⁺ and CD8⁺ cells.

10 From the foregoing it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, various modifications may be made without deviating from the spirit and scope of the invention. Accordingly, the invention is not limited except as by the appended claims. All of references, patents, patent applications, etc. cited above, are incorporated herein
15 in their entirety. Further, all numerical ranges recited herein explicitly include all integer values within the range.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

84

CLAIMS

1. A method for stimulating a population of T-cells by simultaneous T-cell concentration and cell surface moiety ligation, comprising:

(a) providing a population of cells wherein at least a portion thereof comprises T-cells;

(b) contacting said population of cells with a surface, wherein said surface has attached thereto one or more agents that ligate a cell surface moiety of at least a portion of said T-cells and stimulates at least said portion of T-cells.

(c) applying a force that predominantly drives T-cell concentration and T-cell surface moiety ligation, thereby inducing T-cell stimulation.

2. The method of claim 1, wherein said surface has attached thereto a first agent that ligates a first cell surface moiety of a T-cell; and the same or a second surface has attached thereto a second agent that ligates a second moiety of said T-cell, wherein said ligation by the first and second agent induces proliferation of said T-cell.

3. The method of claim 1, wherein said surface is biocompatible.

4. The method of claim 3, wherein said surface is natural or synthetic.

5. The method of claim 4, wherein said surface comprises a polymer.

6. The method of claim 5, wherein said surface is selected from the group consisting of collagen, purified proteins, purified peptides, polysaccharides, glycosaminoglycans, and extracellular matrix compositions.

7. The method of claim 6, wherein the polysaccharides are selected from the group consisting of chitosan, alginate, dextran, hyaluronic acid, and cellulose.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

85

8. The method of claim 5, wherein the polymer is selected from the group consisting of polystyrene, polycarbonates, polyethers, polyanhydrides, polyalkylcyanoacrylates, polyacrylamides, polyorthoesters, polyphosphazenes, polyvinylacetates, block copolymers, polypropylene, polytetrafluoroethylene (PTFE), and polyurethanes.

9. The method of claim 8, wherein the polymer comprises lactic acid.

10. The method of claim 5, wherein the polymer is a copolymer.

11. The method of claim 10, wherein the copolymer comprises lactic acid and glycolic acid (PLGA).

12. The method of claim 3, wherein the biocompatible surface is biodegradable.

13. The method of claim 3, wherein the biocompatible surface is non-biodegradable.

14. The method of claim 13, wherein the non-biodegradable substance comprises a polymer selected from the group consisting of poly(dimethylsiloxane) and poly(ethylene-vinyl acetate).

15. The method of claim 3, wherein the biocompatible surface is selected from the group consisting of collagen, metal, hydroxyapatite, glass, aluminate, bioceramic materials, hyaluronic acid polymers, alginate, acrylic ester polymer, lactic acid polymer, glycolic acid polymer, lactic acid/glycolic acid polymer, purified proteins, purified peptides, and extracellular matrix compositions.

16. The method of claim 3, wherein the biocompatible surface is associated with an implantable device.

WO 01/62895

PCT/US91/06139

86

17. The method of claim 16, wherein the device is selected from the group consisting of: a stent, a catheter, a fiber, a hollow fiber, a patch, and a suture.

18. The method of claim 4, wherein said surface is selected from the group consisting of glass, silica, silicone, collagen, hydroxyapatite, hydrogels, PTFE, polypropylene, polystyrene, nylon, and polyacrylamide.

19. The method of claim 4, wherein said surface is selected from the group consisting of a lipid, a plate, a dish, a bag, a rod, a pellet, a fiber, and a mesh.

20. The method of claim 4, wherein said surface is a particle.

21. The method of claim 20, wherein the particle is selected from the group consisting of a bead, a microsphere, a nanoparticle, and a colloidal particle.

22. The method of claim 21, wherein said bead is about 5 nanometers to about 500 microns in diameter.

23. The method of claim 1, wherein said agents are independently selected from the group consisting of a protein ligand, a natural ligand, and a synthetic ligand.

24. The method of claim 23, wherein said agents are independently selected from the group consisting of an antibody, an antibody fragment, a peptide, a polypeptide, a glycopeptide, a receptor, a steroid, a hormone, a mitogen, an antigen, a superantigen, a growth factor, a cytokine, a lectin, a viral protein, an adhesion molecule, and a chemokine.

25. The method of claim 24, wherein at least one agent is an antibody or an antibody fragment.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

87

26. The method of claim 24, wherein a first agent is an antibody and a fragment thereof, and a second agent is an antibody or a fragment thereof.

27. The method of claim 26, wherein said first and said second agents are different antibodies.

28. The method of claim 24, wherein said first agent is an anti-CD3 antibody, an anti-CD2 antibody, or an antibody fragment of an anti-CD3 or anti-CD2 antibody.

29. The method of either claim 24 or 27, wherein said second agent is an anti-CD28 antibody or antibody fragment thereof.

30. The method of either claim 24 or 27, wherein said second agent is a natural ligand for CD28.

31. The method of claim 30, wherein said natural ligand comprises B7-1 or B7-2.

32. The method of claim 1, wherein said force is selected from the group consisting of a force greater than gravitational force, a hydraulic force, a filtration force generated by transmembrane pressure, a centrifugal force, and a magnetic force.

33. The method of claim 32, wherein the magnetic force is generated by a magnet having a magnetic field strength ranging from between about 200 gauss to about 12,000 gauss at the surface of the magnet.

34. The method of claim 1, wherein said surface is a surface of a paramagnetic particle.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

88

35. The method of claim 1, wherein said agents' attachment to the surface is covalent, noncovalent, electrostatic, or hydrophobic.

36. The method of claim 1, wherein the T-cells that are ligated are separated from the T-cells that are not ligated.

37. The method of claim 1, wherein said T-cells ameliorate immune response dysfunction.

38. A method for stimulation of T-cells by simultaneous cell surface moiety ligation and T-cell aggregation, comprising:

- (a) providing a cell population comprising T-cells;
- (b) contacting said cell population with a surface, wherein said surface has attached thereto one or more ligands specific for a cell surface moiety;
- (c) applying a force that drives concentration of T-cells and surface; and
- (d) incubating said cells for a period of time sufficient to achieve desired stimulation.

39. The method of claim 38, wherein said time sufficient to achieve desired stimulation is from 1 minute to 8 days.

40. The method of claim 39, wherein said time sufficient to achieve desired stimulation is from 1 day to 5 days.

41. The method of claim 38, wherein said surface is biocompatible.

42. The method of claim 41, wherein said surface is natural or synthetic.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

89

43. The method of claim 42, wherein the surface is selected from the group consisting of glass, silica, silicon, collagen, hydroxyapatite, hydrogels, PTFE, polypropylene, polystyrene, nylon, dextran, and polyacrylamide.

44. The method of claim 38, wherein said surface is selected from the group consisting of a plate, a dish, a bag, a rod, a pellet, a fiber, and a mesh.

45. The method of claim 38, wherein said surface is a particle.

46. The method of claim 45, wherein the particle is selected from the group consisting of a bead, a microsphere, a nanoparticle, and a colloidal particle.

47. The method of claim 46, wherein said bead is about 5 nanometers to about 500 microns in diameter.

48. The method of claim 38, wherein said ligand is selected from the group consisting of a protein, a natural ligand, and a synthetic ligand.

49. The method of claim 38, wherein said ligand is selected from the group consisting of an antibody, an antibody fragment, a peptide, a polypeptide, a glycopeptide, a soluble receptor, a steroid, a hormone, a mitogen, an antigen, a ligand, a superantigen, a growth factor, a cytokine, a lectin, and a chemokine.

50. The method of claim 49, wherein at least one ligand is an antibody or a fragment thereof.

51. The method of claim 49, wherein at least two ligands are an antibody or a fragment thereof.

WO 01/62895

PCT/US81/06139

90

52. The method of claim 49, wherein at least two ligands are present and are different antibodies or fragments thereof.

53. The method of claim 49, wherein at least one ligand is an anti-CD3 antibody, an anti-CD2 antibody, or an antibody fragment of an anti-CD3 or anti-CD2 antibody.

54. The method of either claim 49 or 53, wherein at least one ligand is an anti-CD28 antibody or antibody fragment thereof.

55. The method of either claim 49 or 53, wherein at least one ligand is a natural ligand for CD28.

56. The method of claim 53, wherein said natural ligand comprises B7-1 or B7-2.

57. The method of claim 38, wherein said force is selected from the group consisting of a force greater than gravitational force, a hydraulic force, a filtration force generated by transmembrane pressure, a centrifugal force, and a magnetic force.

58. The method of claim 57, wherein the magnetic force is generated by a magnet having a magnetic field strength ranging from between about 200 gauss to about 12,000 gauss at the surface of the magnet.

59. The method of claim 38, wherein said surface is a surface of a paramagnetic particle.

60. The method of claim 38, wherein said ligand attachment to the surface is covalent, noncovalent, electrostatic, or hydrophobic.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

91

61. The method of claim 38, further comprising prior to or concurrently with step (d), separating T-cells concentrated with surface from non-concentrated cells.

62. A method adapted for inducing T-cell activation *in vivo*, comprising providing paramagnetic particles to an animal, said particles having attached thereto, ligands specific for a T-cell surface moiety that induces T-cell activation; applying a magnetic field to a discrete region of the animal; and thereby inducing localization and activation of T-cells bound to said particles at said discrete region.

63. A method for stimulating a population of target cells by simultaneous target cell concentration and target cell surface moiety ligation, comprising:

(a) providing a population of cells wherein at least a portion thereof comprises target cells;

(b) contacting said population of cells with a surface, wherein said surface has attached thereto one or more agents that ligate a cell surface moiety of at least a portion of said target cells and stimulates at least said portion of target cells.

(c) applying a force that predominantly drives target cell concentration and target cell surface moiety ligation, thereby inducing target cell stimulation.

64. The method of claim 63, wherein said surface has attached thereto a first agent that ligates a first cell surface moiety of a target cell; and the same or a second surface has attached thereto a second agent that ligates a second moiety of said target cell, wherein said ligation by the first and second agent induces signal transduction in said target cell.

65. The method of claim 63, wherein said surface is biocompatible.

66. The method of claim 65, wherein said surface is natural or synthetic.

67. The method of claim 66, wherein said surface comprises a polymer.

W/O 01/62885

PCT/HIS01/06139

92

68. The method of claim 67, wherein said surface is selected from the group consisting of collagen, purified proteins, purified peptides, polysaccharides, glycosaminoglycans, and extracellular matrix compositions.

69. The method of claim 68, wherein the polysaccharides are selected from the group consisting of chitosan, alginate, dextran, hyaluronic acid, and cellulose.

70. The method of claim 67, wherein the polymer is selected from the group consisting of polyesters, polyethers, polyamides, polyalkylcyanoacrylates, polyacrylamides, polyorthoesters, polyphosphazenes, polyvinylacetates, block copolymers, polypropylene, polytetrafluoroethylene (PTFE), and polyurethanes.

71. The method of claim 70, wherein the polymer comprises lactic acid.

72. The method of claim 67, wherein the polymer is a copolymer.

73. The method of claim 72, wherein the copolymer comprises lactic acid and glycolic acid (PLGA).

74. The method of claim 65, wherein the biocompatible surface is biodegradable.

75. The method of claim 65, wherein the biocompatible surface is non-biodegradable.

76. The method of claim 75, wherein the non-biodegradable substance comprises a polymer selected from the group consisting of poly(dimethylsiloxane) and poly(ethylene-vinyl acetate).

WQ 01/62895

PCT/US81/06139

93

77. The method of claim 65, wherein the biocompatible surface is selected from the group consisting of collagen, metal, hydroxyapatite, bioglass, aluminate, bioceramic materials, hyaluronic acid polymers, alginate, acrylic ester polymer, lactic acid polymer, glycolic acid polymer, lactic acid/glycolic acid polymer, purified proteins, purified peptides, and extracellular matrix compositions.

78. The method of claim 65, wherein the biocompatible surface is associated with an implantable device.

79. The method of claim 78, wherein the device is selected from the group consisting of: a stent, a catheter, a fiber, a hollow fiber, a patch, and a suture.

80. The method of claim 66, wherein said surface is selected from the group consisting of glass, silica, silicon, collagen, hydroxyapatite, hydrogels, PTFE, polypropylene, polystyrene, nylon, and polyacrylamide.

81. The method of claim 66, wherein said surface is selected from the group consisting of a lipid, a plate, a dish, a bag, a rod, a pellet, a fiber, and a mesh.

82. The method of claim 66, wherein said surface is a particle.

83. The method of claim 82, wherein the particle is selected from the group consisting of a bead, a microsphere, a nanoparticle, and a colloidal particle.

84. The method of claim 83, wherein said bead is about 5 nanometers to about 500 microns in diameter.

85. The method of claim 63, wherein said agents are independently selected from the group consisting of a protein ligand, a natural ligand, and a synthetic ligand.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

94

86. The method of claim 85, wherein said agents are independently selected from the group consisting of an antibody, an antibody fragment, a peptide, a polypeptide, a glycopeptide, a receptor, a steroid, a hormone, a mitogen, an antigen, a superantigen, a growth factor, a cytokine, a lectin, a viral protein, an adhesion molecule, and a chemokine.

87. The method of claim 86, wherein at least one agent is an antibody or an antibody fragment.

88. The method of claim 86, wherein a first agent is an antibody or a fragment thereof, and a second agent is an antibody or a fragment thereof.

89. The method of claim 86, wherein said first and said second agents are different antibodies or fragments thereof.

90. The method of claim 63, wherein said force is selected from the group consisting of a force greater than gravitational force, a hydraulic force, a centrifugal force, a filtration force generated by transmembrane pressure, and a magnetic force.

91. The method of claim 32, wherein the magnetic force is generated by a magnet having a magnetic field strength ranging from between about 200 gauss to about 12,000 gauss at the magnet surface.

92. The method of claim 63, wherein said surface is a surface of a paramagnetic particle.

93. The method of claim 63, wherein said agents' attachment to the surface is covalent, noncovalent, electrostatic, or hydrophobic.

W/O 01/62895

PCT/US81/06139

95

94. A method for stimulation of target cells by cell surface moiety ligation and target cell concentration, comprising:

- (a) providing a cell population comprising target cells;
- (b) contacting said cell population with a surface, wherein said surface has attached thereto one or more ligands specific for a cell surface moiety;
- (c) applying a force that drives concentration of target cells and concentration of said cells on said surface; and
- (d) incubating said cells for a period of time sufficient to achieve desired stimulation;

95. The method of claim 94, wherein said time sufficient to achieve desired stimulation is from about 1 minute to about 30 days.

96. The method of claim 95, wherein said time sufficient to achieve desired stimulation is from about 1 day to about 5 days.

97. The method of claim 94, wherein said surface is biocompatible.

98. The method of claim 97, wherein said surface is natural or synthetic.

99. The method of claim 98, wherein the surface is selected from the group consisting of glass, silica, silicon, collagen, hydroxyapatite, hydrogels, PTFE, polypropylene, polystyrene, nylon, dextran, and polyacrylamide.

100. The method of claim 94, wherein said surface is selected from the group consisting of a plate, a bag, a dish, a rod, a pellet, a fiber, and a mesh.

101. The method of claim 94, wherein said surface is a particle.

WO 01/62895

PCT/US98/06139

96

102. The method of claim 101, wherein the particle is selected from the group consisting of a bead, a microsphere, a nanoparticle, and a colloidal particle.

103. The method of claim 102, wherein said bead is about 5 nanometers to about 500 microns in diameter.

104. The method of claim 94, wherein said ligand is selected from the group consisting of a protein, a natural ligand, and a synthetic ligand.

105. The method of claim 94, wherein said ligand is selected from the group consisting of an antibody, an antibody fragment, a peptide, a polypeptide, a glycopeptide, a receptor, a steroid, a hormone, a mitogen, an antigen, a ligand, a superantigen, a growth factor, a cytokine, a lectin, and a chemokine.

106. The method of claim 105, wherein at least one ligand is an antibody or a fragment thereof.

107. The method of claim 105, wherein at least two ligands are an antibody or a fragment thereof.

108. The method of claim 105, wherein at least two ligands are present and are different antibodies or fragments thereof.

109. The method of either claim 63 or 94, wherein said target cells are selected from the group consisting of T-cells, B-cells, or stem cells.

110. The method of claim 94, wherein said force is selected from the group consisting of a force greater than gravitational force, a hydraulic force, a filtration force generated by transmembrane pressure, a centrifugal force, and a magnetic force.

W/O 01/61895

PCT/US91/06139

97

111. The method of claim 110, wherein the magnetic force is generated by a magnet having a magnetic field strength ranging from between about 200 gauss to about 12,000 gauss at the surface of the magnet.

112. The method of claim 94, wherein said surface is a surface of a paramagnetic particle.

113. The method of claim 94, wherein said ligand attachment to the surface is covalent, noncovalent, electrostatic, or hydrophobic.

114. The method of claim 94, further comprising prior to or concurrently with step (d), separating the concentrated target cells from the non-concentrated cells.

115. A method of inducing target cell stimulation *in vivo*, comprising providing paramagnetic particles to an animal, said particles having attached thereto, ligands specific for a target cell surface moiety that induces target cell stimulation; applying a magnetic field to a discrete region of the animal; and thereby inducing localization and stimulation of the target cells bound to said particles at said discrete region.

116. A method for inducing receptor polarization in receptor bearing cells, comprising:

- a) providing a cell population;
- b) contacting said cell population with a solid surface, wherein said solid surface has attached thereto one or more ligands specific for a cell surface receptor present on at least a portion of said cell population; and
- c) applying a force that drives cell concentration and cell surface receptor ligation.

WO 01/62895

PCT/US81/06139

98

117. A method for inducing aggregation of cell surface molecules, comprising:

- a) providing a population of cells having a target cell surface molecule;
- b) contacting said population of cells with a solid surface, wherein said solid surface has attached thereto a ligand for at least one target cell surface molecule
- c) applying a force that drives aggregation of targeted cell surface molecules.

118. The method of claim 117, wherein said cell population comprises lymphocytes.

119. The method of either claim 116 or 117, wherein said solid surface is selected from the group consisting of a plate, a bag, a dish, a rod, a pellet, a fiber, a microsphere, and a bead.

120. The method of either claim 116 or 117, wherein said ligand is selected from the group consisting of an antibody, a natural ligand, and a synthetic ligand.

121. The method of claim 120, wherein said ligand comprises an antibody, a peptide, a polypeptide, a growth factor, a cytokine, or a chemokine.

122. The method of either claim 116 or 117, wherein said force is selected from the group consisting of a force greater than gravitational force, a hydraulic force, a force generated by transmembrane pressure, a centrifugal force, and a magnetic force.

123. The method of claim 122, wherein the magnetic force is generated by a magnet having a magnetic field strength ranging from between about 200 gauss to about 12,000 gauss at the surface of the magnet.

WO 01/62895

PCT/US81/06139

99

124. The method of either claim 116 or 117, wherein said solid surface is paramagnetic.

125. The method of either claim 116 or 117, wherein said receptor binding leads to downregulation or suppression of a cellular event.

126. The method of either claim 116 or 117, wherein said receptor binding leads to upregulation or activation of a cellular event.

127. The method of claim 116, wherein said cellular event is receptor mediated signal transduction.

128. The method of claim 94, wherein said force drives concentration or orientation of cell surface moieties.

129. A method for inducing a population of T-cells to proliferate, comprising contacting the T-cells with a solid surface for a period of time of between about two hours and about nine days, said solid surface having immobilized thereon a first agent and second agent, and wherein said first agent provides an activation signal and said second agent provides a co-stimulatory signal to said T-cells.

130. The method of claim 129 wherein said period of time is between about two hours and about forty-eight hours.

131. The method of claim 130 wherein said period of time is between about two hours and about twelve hours.

132. The method of claim 129 wherein said period of time is between about two and about eight days.

WO 01/62895

PCT/ISR1/06139

100

133. The method of claim 129 wherein said period of time is between about three and about six days.

134. The method of claim 129 wherein said first and second agent are immobilized on the same solid surface.

135. The method of claim 134 wherein said solid surface is selected from the group consisting of a flat surface, an irregular surface, a spherical surface.

136. The method of claim 129 wherein said solid surface is a bead.

137. The method of claim 135 wherein said irregular surface is a plastic surface.

138. The method of claim 129 wherein said first agent comprises an antibody or fragment thereof that binds CD3 and said second agent comprises an antibody or fragment thereof that binds CD28.

139. A population of T-cells produced by any one of methods 129-138.

140. A composition comprising the population of T-cells according to claim 139 and a pharmaceutically acceptable excipient.

141. A method for inducing a population of T-cells to proliferate, comprising:

- a. activating a population of T-cells by contacting said T-cells with a first agent immobilized on a bead, wherein said bead has a diameter of between about 20 microns to about 1 millimeter; and
- b. stimulating an accessory molecule on the surface of said T-cells with a second agent that binds the accessory molecule, wherein said second agent is immobilized on the bead, and thereby inducing proliferation of the T cells.

W/O 01/62895

PCT/US81/06139

101

142. The method of claim 141, wherein said bead has a diameter of between about 80 microns and about 500 microns.

143. The method of claim 142, wherein said bead has a diameter of between about 100 microns and about 400 microns.

144. The method of claim 143, wherein said beads have a diameter of between about 250 microns and 300 microns.

145. The method of any one of claims 141-144, where said bead is a paramagnetic bead.

146. The method of claim 141, wherein the first agent comprises an anti-CD3 antibody and the second agent comprises an anti-CD28 antibody.

147. The method of claim 146, wherein the population of T-cells comprises helper T-cells.

148. The method of any one of claims 141-144, further comprising separating the bead from the T-cells by filtration.

149. The method of claim 148, wherein the first agent comprises an anti-CD3 antibody and the second agent comprises an anti-CD28 antibody.

150. The method of claim 149, wherein the population of T-cells comprises helper T-cells.

151. A population of activated T-cells, wherein at least a subset of the cells have a phenotype in which CD154 levels peak between about one and about four days post-stimulation.

WO 01/62895

PCT/US81/06139

102

152. A population of activated T-cells, wherein said population comprises greater than about 60% CD4⁺ T-cells.

153. A population of activated T-cells, wherein said population comprises at least about 70% CD4⁺ T-cells.

154. A population of activated T-cells previously stimulated to proliferate by contact with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or fragments thereof for a period of about two hours to about nine days.

155. The population of claim 154 wherein said period of contact is from about four hours to about eight days.

156. The population of claim 154 wherein said period of contact is from about four hours to about eight days.

157. A population of activated T-cells wherein said T-cells have previously been induced to proliferate by contact with an immobilized first agent and second agent for a period of between about two hours and about nine days, wherein said first agent provides an activation signal and said second agent provides a co-stimulatory signal to said T-cells.

158. The population of claim 157 wherein said T-cells produce peak interleukin-4 levels between about two and about seven days post-primary and secondary signal activation.

159. The population of claim 157 wherein said T-cells produce peak interleukin-2 levels between about two and about seven days post-primary and secondary signal activation.

WO 01/62895

PCT/US01/06139

103

160. The population of claim 157 wherein said T-cells produce peak tumor necrosis factor-alpha or interferon-gamma levels between about two and about seven days post-primary and secondary signal activation.

161. A composition comprising the T-cells of any one of claims 151-160 and a pharmaceutically acceptable excipient.

162. A method for depleting monocytes from a suspension comprising T-cells and monocytes, comprising contacting the suspension with para-magnetic beads, wherein said beads have a diameter of between about 2.8 μm and about 10 μm , and subsequently separating the monocytes from the suspension by magnetic attraction.

163. The method of claim 162, wherein the suspension is a whole blood cell suspension.

164. The method of any one of claims 162 and 163, wherein the bead has at least one antibody attached thereto.

165. The method of claim 164, wherein the antibody is a non-specific antibody.

166. A method of treating tumors in a patient, comprising administering to the patient the pharmaceutical composition of claim 161.

167. The method of claim 166, wherein the patient is depleted of endogenous lymphocytes prior to administration.

168. The method of claim 166, wherein the T-cells are derived from the patient prior to activation.

WO 01/62895

PCT/US91/06139

104

169. The method of claim 166, wherein the T-cell population has been depleted of monocytes.

170. A population of stimulated T-cells having CD154 expression levels at least 10% higher than T-cells that have been stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the absence of simultaneous concentration and stimulation, wherein said levels are determined by flow cytometry between days 1 to 4 following T-cell stimulation.

171. A population of stimulated T-cells having CD25 expression levels at least 10% higher than T-cells that have been stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the absence of simultaneous concentration and stimulation, wherein said levels are determined by flow cytometry between days 1 to 4 following T-cell stimulation.

WO 01/62895

PCT/US91/06139

1/42

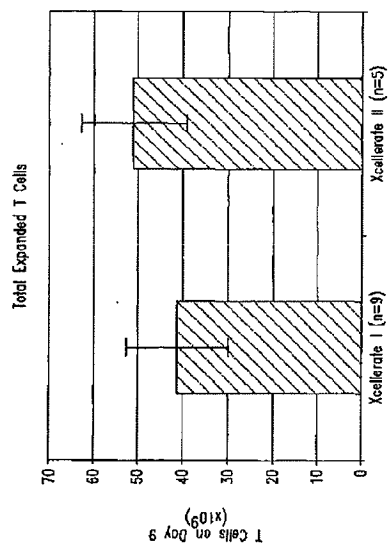


Fig. 1

WQ 01/62895

PCT/US01/06139

2/42

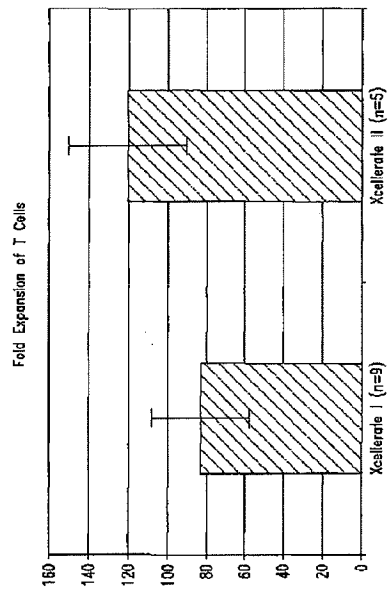


Fig. 2

WO 01/62895

PCT/US01/04139

3/42

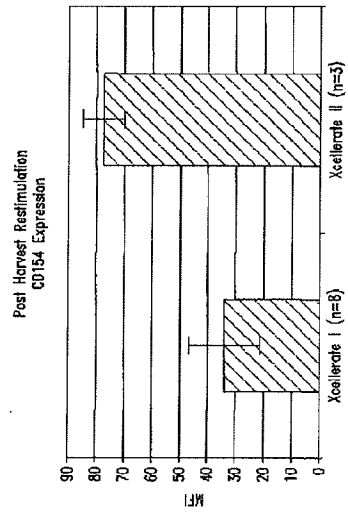
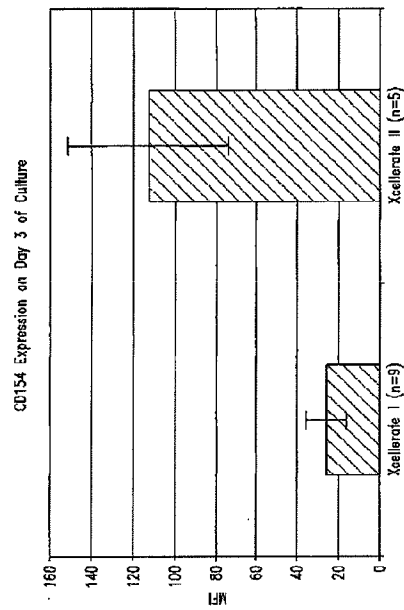


Fig. 3

WO 01/62895

PCT/US01/06139

4/42

*Fig. 4*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WU 01/62295

PCT/US01/06139

5/42

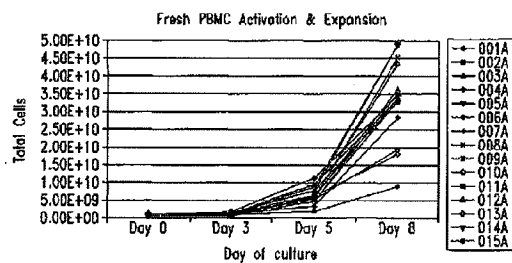


Fig. 5A

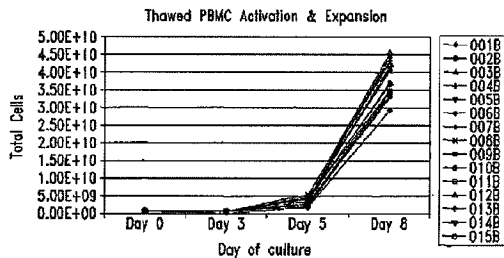


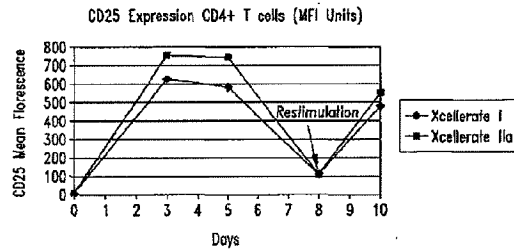
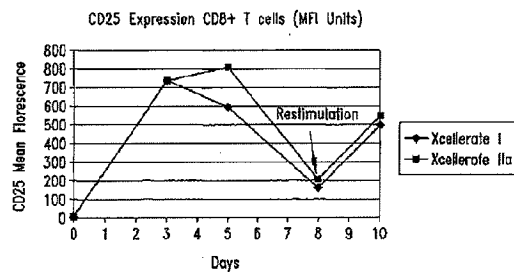
Fig. 5B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/62885

PCT/US91/06139

6/42

*Fig. 6A**Fig. 6B*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/62895

PCT/US01/06139

7/42

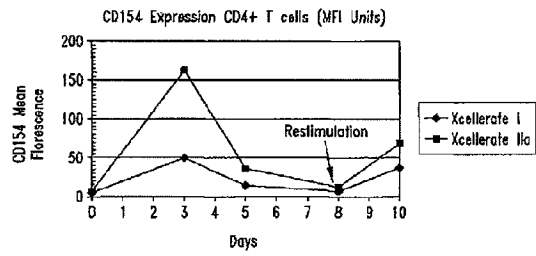


Fig. 7A

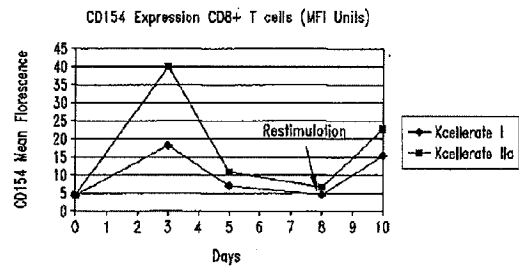


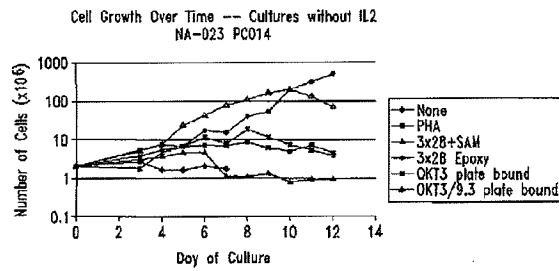
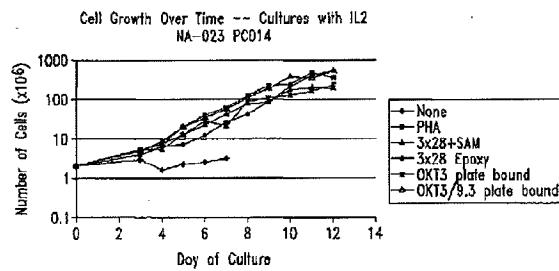
Fig. 7B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WD 01/62895

PCT/US81/06139

8/42

*Fig. 8A**Fig. 8A*

WO 01/62895

PCT/US91/06139

9/42

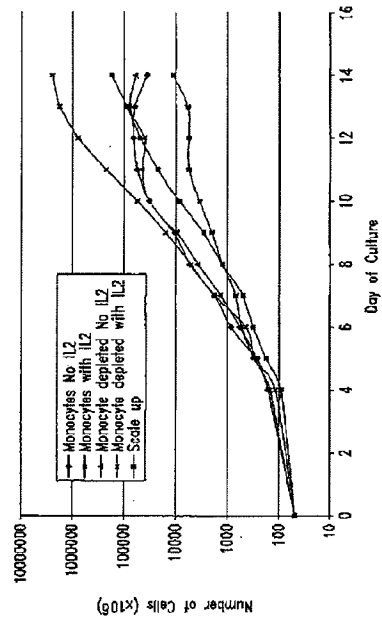


Fig. 9

WD 01/62895

PCT/US81/06139

10/42

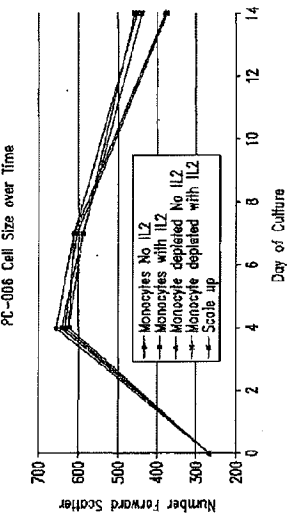


Fig. 10

WO 01/62895

PCT/ISA1/06139

11/42

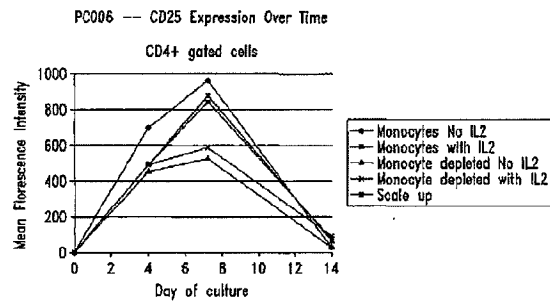


Fig. 11A

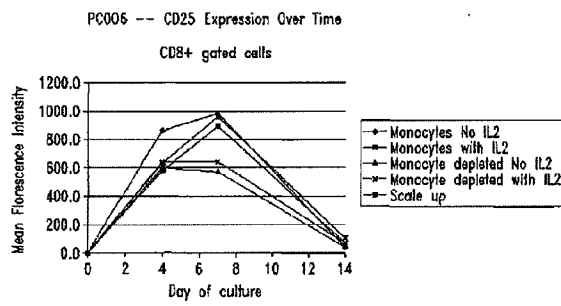


Fig. 11B

WO 01/62895

PCT/US81/06139

12/42

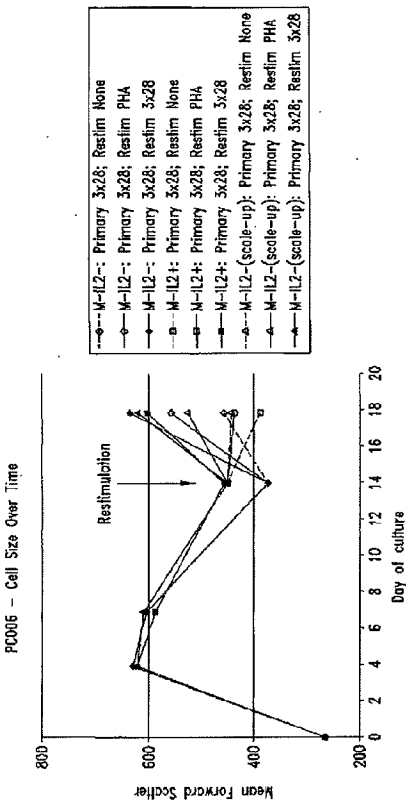


Fig. 12

WO 01/62895

PCT/US91/06139

13/42

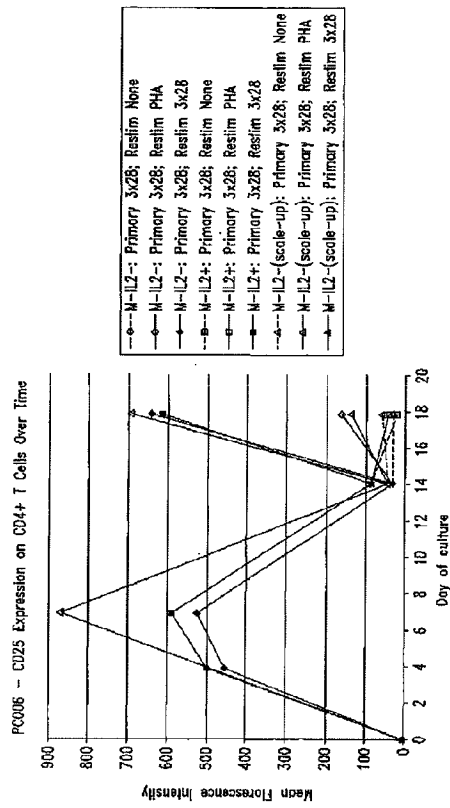


Fig. 13A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/62895

PCT/US81/06139

14/42

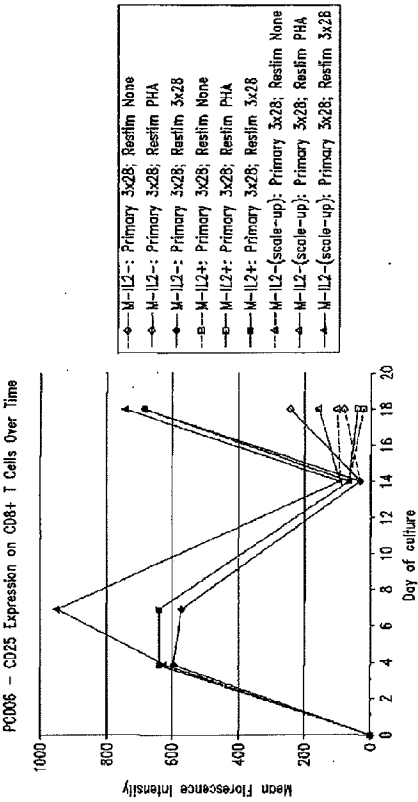
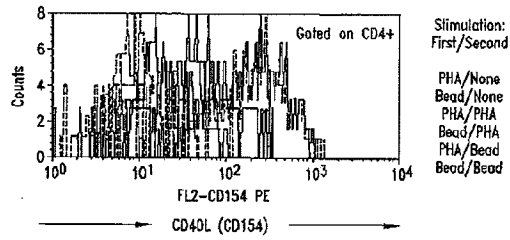
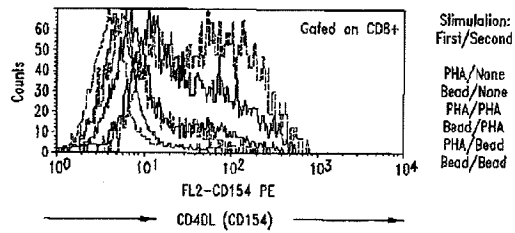


Fig. 13B

WO 01/62895

PCT/US81/06139

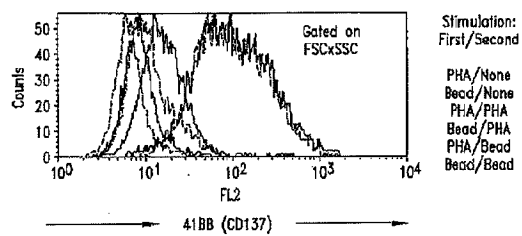
15/42

*Fig. 14A**Fig. 14B*

WQ 01/62885

PCT/US01/06139

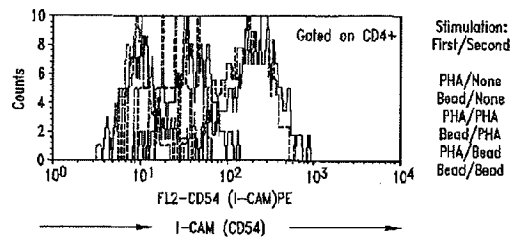
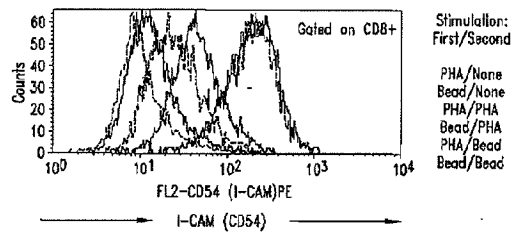
16/42

*Fig. 15*

WO 01/62895

PCT/HUS81/06139

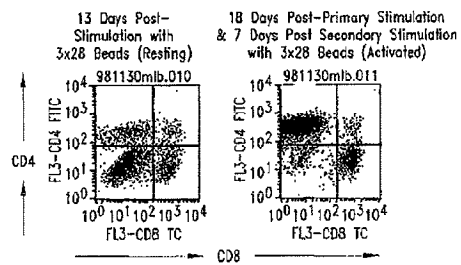
17/42

*Fig. 16A**Fig. 16B*

WO 01/62895

PCT/US81/06139

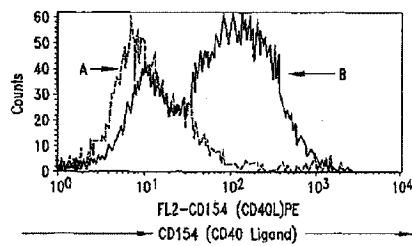
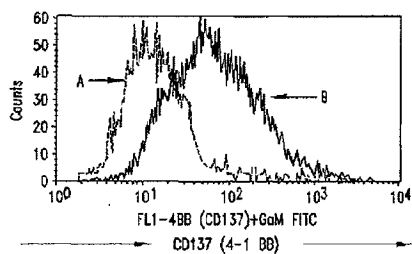
18/42



WO 01/62895

PCT/US91/06139

19/42

*Fig. 17C**Fig. 17D*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/62895

PCT/US98/06339

20/42

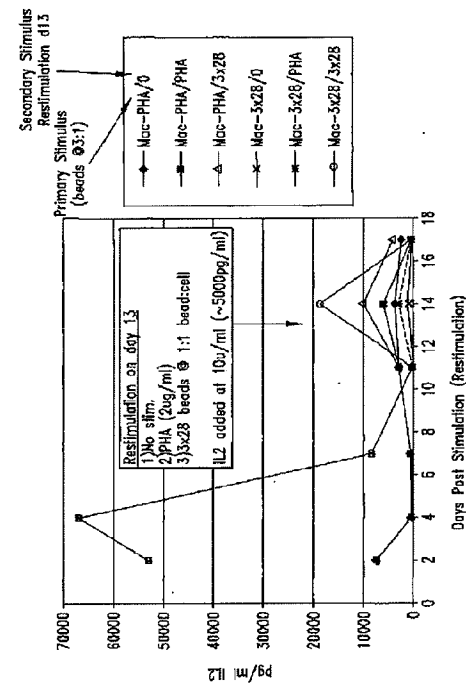


Fig. 18A

W/O 01/61895

PCT/ISR1/06139

21/42

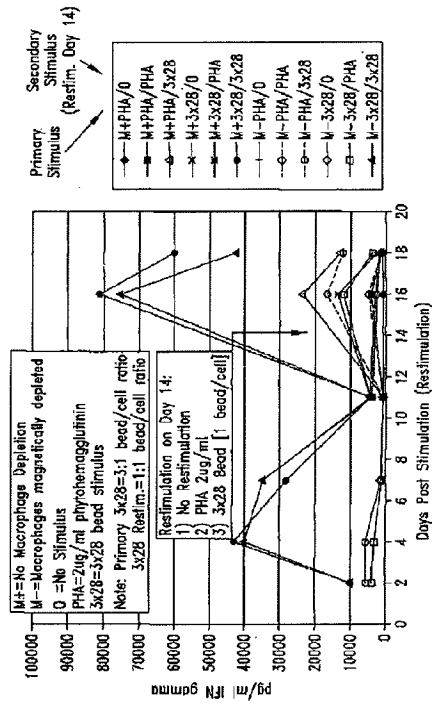


Fig. 18B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WU 01/62895

PCT/US01/06139

22/42

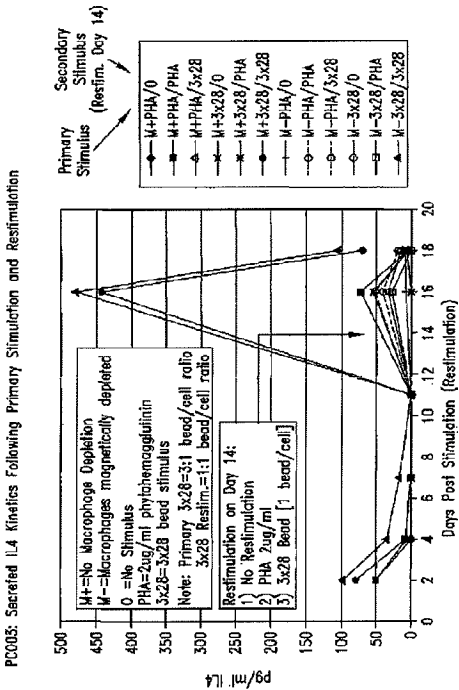
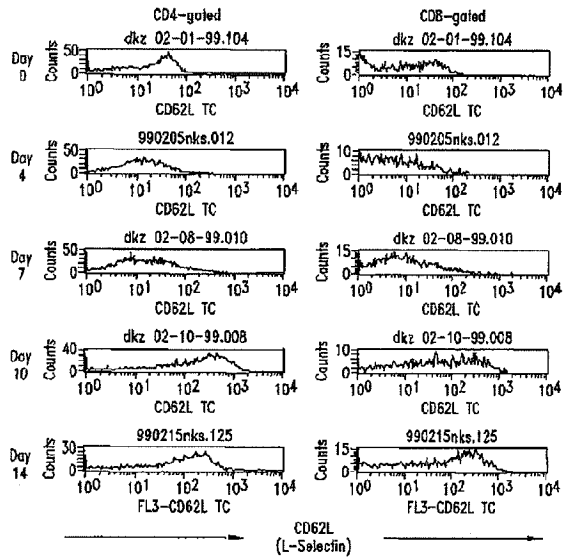


Fig. 18C

WO 01/62895

PCT/US01/06139

23/42

*Fig. 19A*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/62895

PCT/US01/06139

24/42

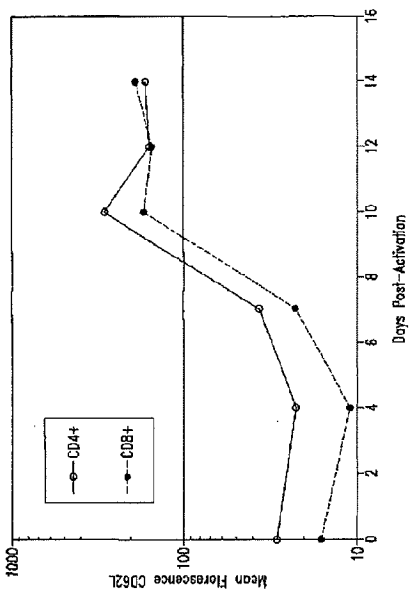


Fig. 19B

WO 01/62898

PCT/US01/06139

25/42

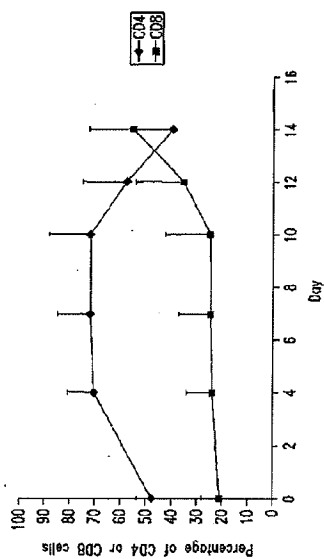


Fig. 18C

WO 01/62895

PCT/US01/06139

26/42

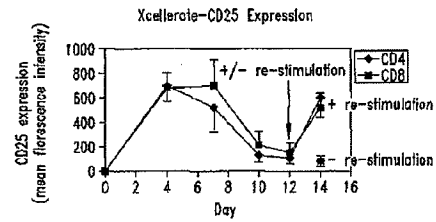


Fig. 21A

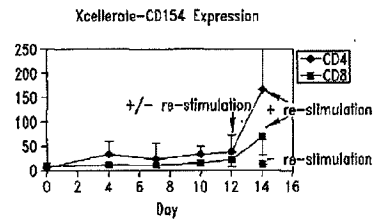


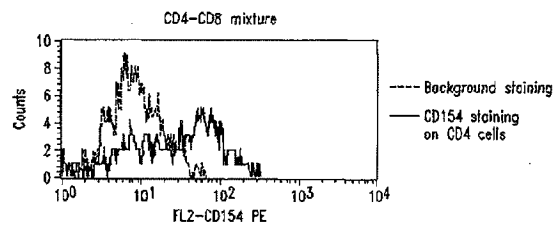
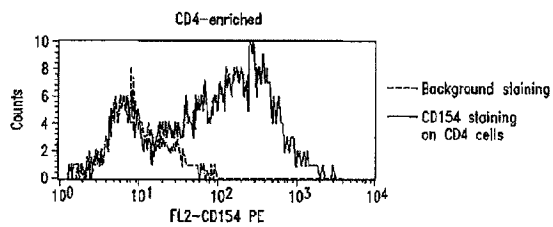
Fig. 21B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/62895

PCT/US01/06139

27/42

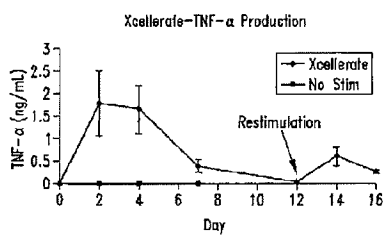
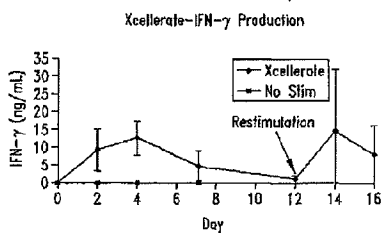
*Fig. 22A**Fig. 22B*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

W43 01/62895

PCT/US01/06139

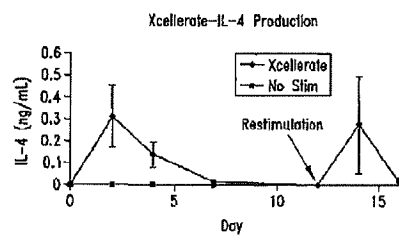
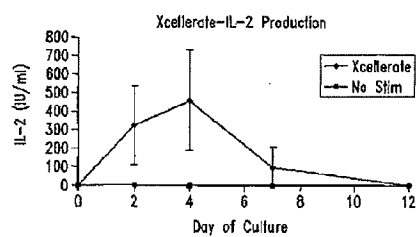
28/42

*Fig. 23A**Fig. 23B*

WO 01/62895

PCT/US98/06139

29/42

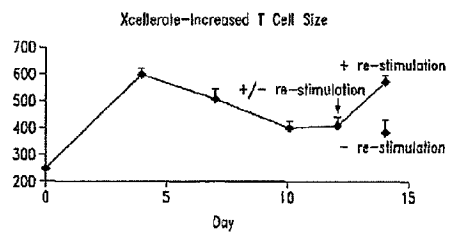
*Fig. 24A**Fig. 24B*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/62895

PCT/US01/06139

30/42

*Fig. 25*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/62895

PCT/AUS196139

31/42

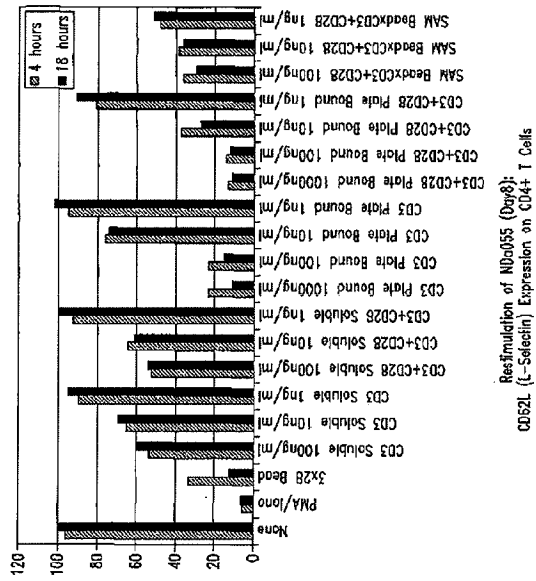


Fig. 26A

582895/10.03

PCT/JP01/06139

32/42

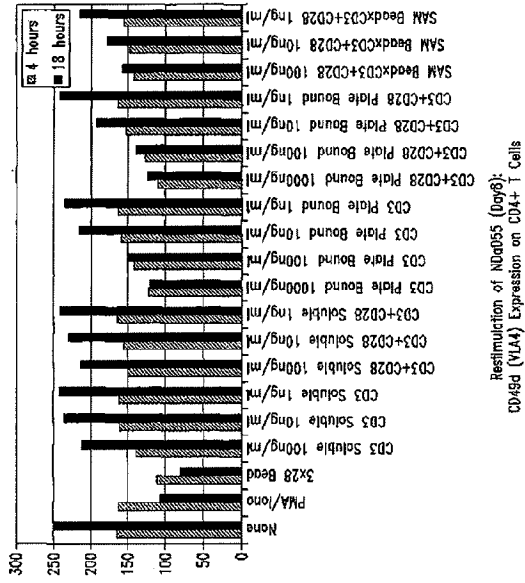


Fig. 26B

W/O 01/62895

PCT/ISA/1/06139

33/42

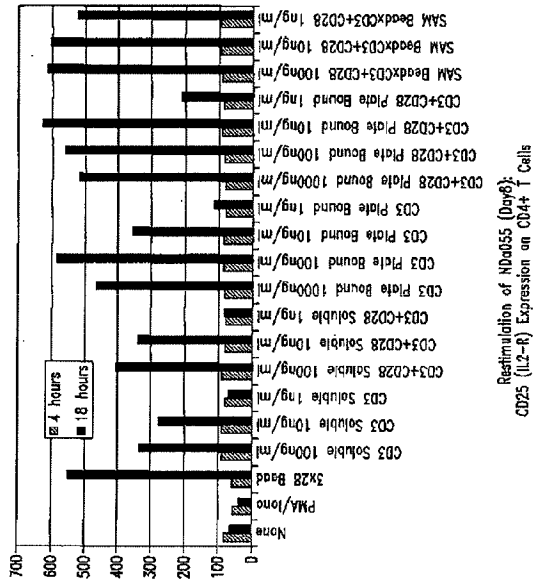


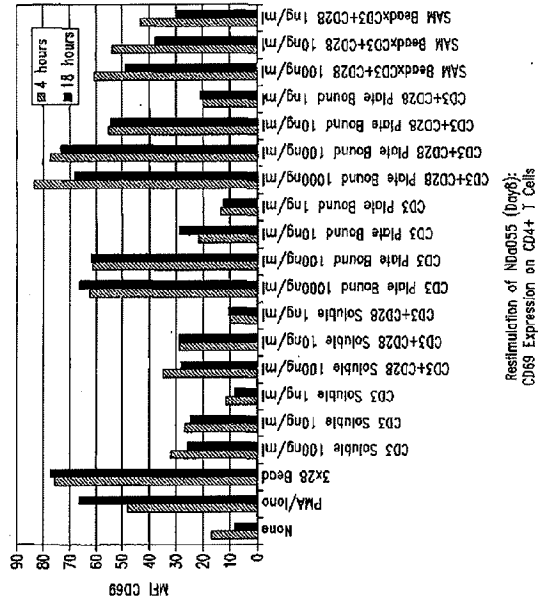
Fig. 26C

Restimulation of ND055 (Day6):
CD25 (IL-2-R) Expression on CD4+ T Cells

WO 01/62895

PCT/US01/06139

34/42



W13 01/6/2895

PCT/JP01/06139

35/42

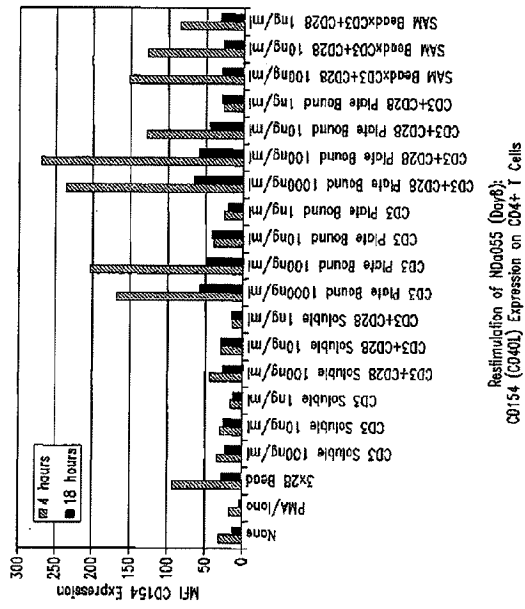


Fig. 26E

WD 01/6/2005

PCT/US181/04139

36/42

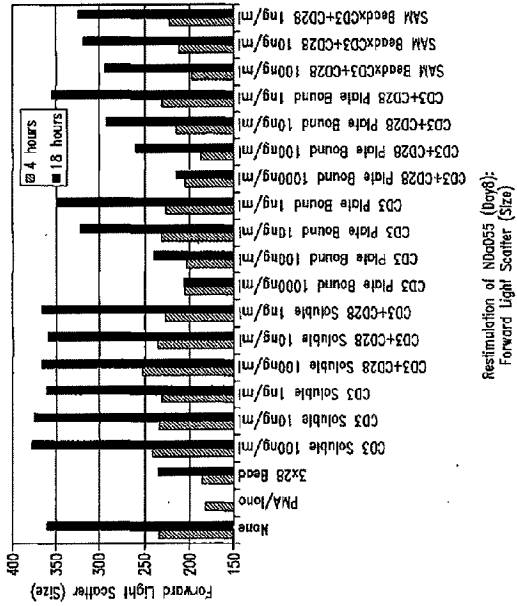


Fig. 26F

W13 01/03/05

PCT/JP01/06139

37/42

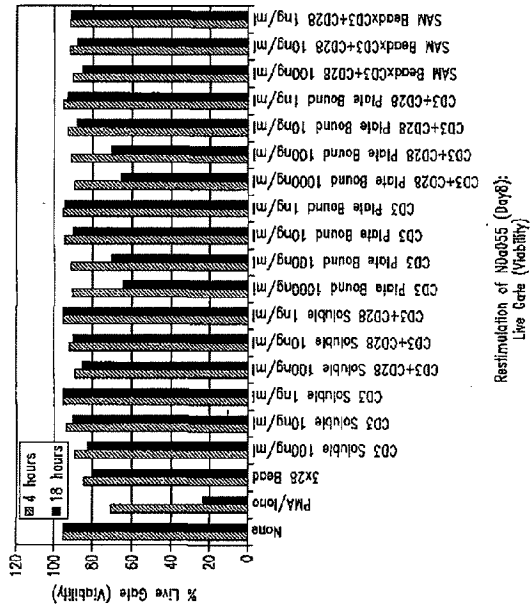


Fig. 26G

56262/10 (1A)

PC-T/18181.24

38/42

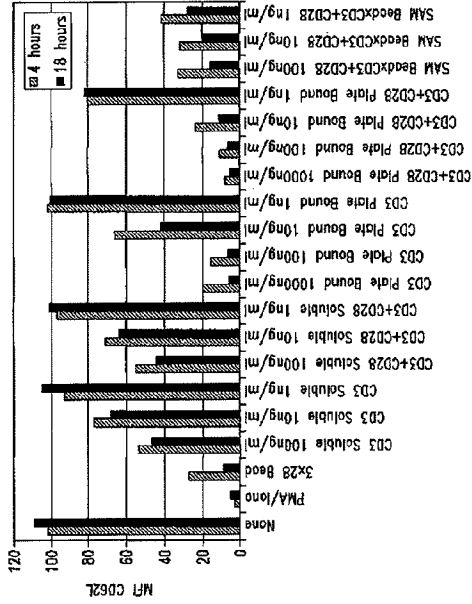


Fig. 26H

WO 01/62895

PCT/JP01/06139

39/42

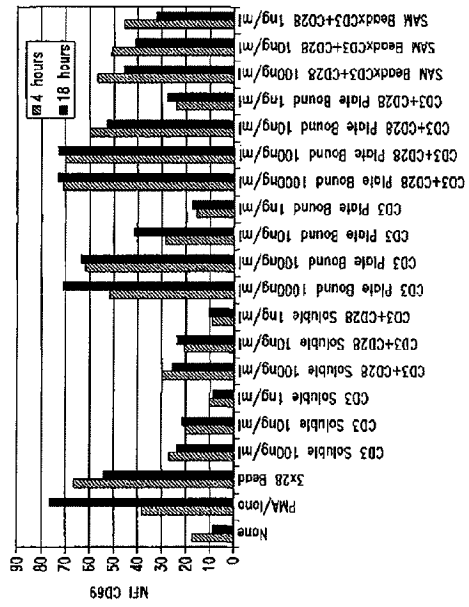


Fig. 26I

Fig. 26J

W(1) 01/62895

PCT/US01/06139

41/42

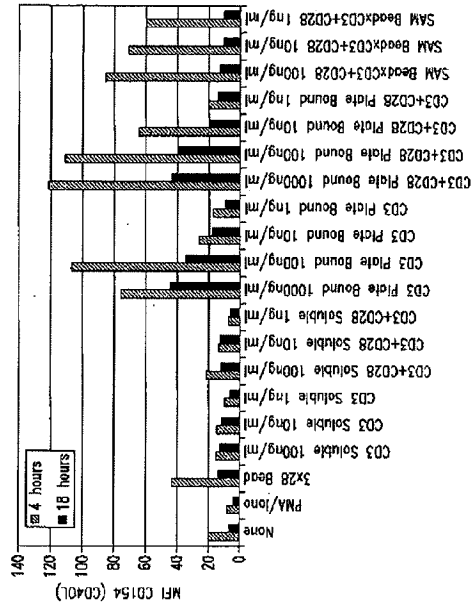


Fig. 26K

5862/10 (13) M

PCT/JP04/000095

42/42

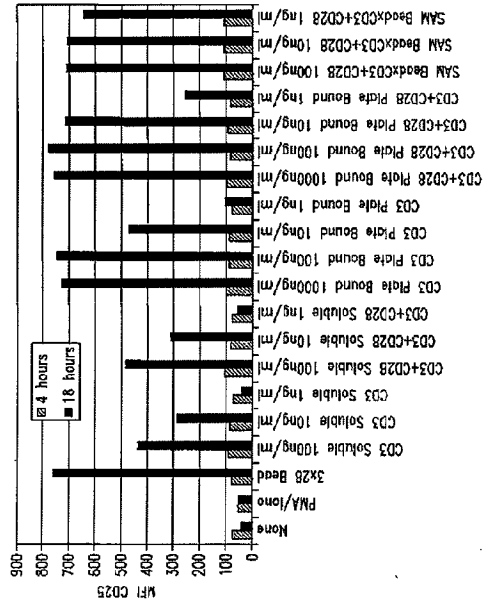


Fig. 26L

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 August 2001 (30.08.2001)

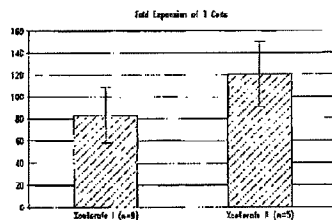
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/62895 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 5/00, 5/06, C07K 16/00, A61K 31/00, 31/02, 31/03, C07K 10/00, C07K 10/01, 25/02, 25/03, 31/04, 25/05, C07K 14/00, 14/01, B10C 1/00, A61K 9/70
- (21) International Application Number: PCT/US01/06139
- (22) International Filing Date: 26 February 2001 (26.02.2001)
- (23) Filing Language: English
- (24) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/184,788 24 February 2000 (24.02.2000) US
60/249,902 17 November 2000 (17.11.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): KCVTE THERAPIES, INC. [US/US]; Suite 130, 1124 Columbia Street, Seattle, WA 98104 (US).
- (72) Inventor: and
(73) Invention Applicants (for US only): BERENSON, Ron
- (74) Agents: CHRISTIANSEN, William, L. et al.; Seed Intellectual Property Law Group PLLC, Suite 600, 701 Fifth Avenue, Seattle, WA 98104-2092 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GT, HK, HU, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LS, LR, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, ND, NZ, NL, NO, NU, NZ, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: SIMULTANEOUS STIMULATION AND CONCENTRATION OF CELLS



WO 01/62895 A3

(57) Abstract: The present invention relates generally to methods for stimulating cells, and more particularly, to a novel method to concentrate and stimulate cells that maximizes stimulation and/or proliferation of such cells, in the various embodiments, cells are stimulated and concentrated with a surface yielding enhanced proliferation, cell signal transduction, and/or cell surface moiety aggregation. In certain aspects methods for stimulating a population of cells such as T-cells, by simultaneous concentration and cell surface moiety ligation are provided by contacting the population of cells with a surface, that has attached thereto one or more agents that ligate a cell surface moiety and applying a force that predominantly drives cell concentration and cell surface moiety ligation, thereby inducing cell stimulation, cell surface moiety aggregation, and/or receptor signaling enhancement. Also provided are methods for producing phenotypically tailored cells, including T cells for the use in diagnostics, drug discovery, and the treatment of a variety of indications, including cancer, viral infections, and immune related disorders. Comparisons of cells having specific phenotypic properties produced by these processes are further provided.

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 10

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "United States Names and Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:
with International search report

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Incorporating PC1/US 01/06139
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/00 C12N5/06 C07K16/18 A61K31/02 A61K31/04 C08L1/00 C08L1/00 C08L5/00 C08L25/02 C08L25/04 C08L31/04 C08L75/00 C07K14/00 C07K1/00 903C1/00		
According to International Patent Classification (IPC) of the parent national application and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Searches conducted according to procedures which include the following classification codes: IPC 7 C12N A61K		
Documents searched other than those mentioned in B.1. (Indicate in the report which documents are included in the fields searched)		
Documents that have been classified during the international search, name of data base and search procedure, search term(s) BIOSES, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Classen of documents, with indication, where appropriate, of the search categories	Reference to document
X	CRESO JENNIFER R ET AL: "The mode and duration of anti-CD28 costimulation determine resistance to infection by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus type 1 in vitro." JOURNAL OF VIROLOGY , vol. 73, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 9337-9347, XP002180421 ISSN: 0022-538X	1-4, 20-22, 24-30, 32-36, 38-42, 45-55, 57-60, 63, 66, 82-90, 92, 94-99, 101-110, 112-114, 116-118, 120-122, 124, 126-129, 134-136, 138, 139,
-/-		
X	Further documents are taken into consideration of Doc C	X
* Special categories of cited documents:		
*1 document relating to the prior art of the invention which is not taken into account for patentability reasons	*1 later document published after the international filing date of the present application and not in conflict with the applicable law	
*2 earlier document not published on or after the international filing date	*2 document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to be obvious in view of the document	
*3 document which may have caused or may cause confusion with the claimed invention (as specified)	*3 document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to be obvious in view of the document	
*4 document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*4 document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to be obvious in view of the document	
*5 document disclosed prior to the international filing date but used from the priority date claimed	*5 document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to be obvious in view of the document	
Date of the actual completion of the international search		
17 October 2001	31/10/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office P.O. Box 1, Patentstr. 2 8001 Zurich, Switzerland Tel. (+41) 044-360-2040, Telex 21 601 400, Fax (+41) 044-360-2010		Authorized official Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC1/US 01/06139
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K9/70		
According to International Patent Classification (IPC) or its both internal classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched according to classification systems followed by classification systems		
Classification searched after classification according to the extent that such documents are included in the terms searched		
Extensive data were furnished during the international search phase of data base and, where possible, search highlights		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Character of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	the whole document --- LARSSON SUSANNE ET AL: "Productive cytomegalovirus (CMV) infection exclusively in CD13-positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals: Implications for prevention of CMV transmission." TRANSPLANTATION (BALTIMORE), vol. 65, no. 3, 15 February 1998 (1998-02-15), pages 411-415, KP001029901 ISSN: 0041-1337 the whole document ---	141, 145-150, 154, 157, 160, 170 162, 163
Further documents are listed in the continuation of page C		
Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document relating to the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" prior document but published on or after the international filing date "C" document which may provide secondary elements or which is used to substantiate the publication date or another claim or other information (as specified) "D" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "F" document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicant's claim as to the state of the art prior to the filing date "G" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to be novel or inventive in view of the document in question alone "H" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to be novel or inventive in view of the document in question alone when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "I" document: member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 October 2001		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2955 München 2 D-85239 München, Germany Tel: +49 (0) 89 30966-1, Fax: +49 (0) 89 30966-3010		Authorized officer: Mateo Rosell, A.M.

Form PCT/ISA/210 (revised March 2001)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.
PCT/US 01/06139

C/Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Details of document(s), with description where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim(s)
A	US 5 735 279 A (EGE THORFINN ET AL) 7 April 1998 (1998-04-07) the whole document	62,115
A	WO 97 01304 A (HALLINCKRODT MEDICAL INC) 16 January 1997 (1997-01-16) the whole document	62,115
P, X	SONYHADI M ET AL: "Xcellerate: An autologous T cell immunotherapy approach for treating B-cell lymphocytic leukemia (B-CLL)." BLOOD, vol. 96, no. 11 Part 1, 16 November 2000 (2000-11-16), page 837a XP000926673 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology; San Francisco, California, USA; December 01-05, 2000 ISSN: 0006-4971 abstract	1-171
P, X	KALAMASZ D ET AL: "Storage/shipment of freshly harvested or cryopreserved Xcellerate™ activated T cells for clinical applications." BLOOD, vol. 96, no. 11 Part 2, 16 November 2000 (2000-11-16), page 316b XP001030572 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology; San Francisco, California, USA; December 01-05, 2000 ISSN: 0006-4971 abstract	1-171
P, X	HAMI L ET AL: "Xcellerate™: A platform process for the GMP manufacture of activated T cells for the treatment of patients with cancer and immune dysfunction." BLOOD, vol. 96, no. 11 Part 1, 16 November 2000 (2000-11-16), page 840a XP001030571 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology; San Francisco, California, USA; December 01-05, 2000 ISSN: 0006-4971 abstract	1-171

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/06139

C. Communications Documents Considered to be Relevant		
Category*	Content of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claims
P, X	<p>POLANSKI M ET AL: "Xcellerate(): A closed, scalable process for the GMP manufacture of stable activated T cells." JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 23, no. 5, September 2000 (2000-09), page 599 XP001030565 15th Annual Scientific Meeting of the Society for Biological Therapy; Seattle, Washington, USA; October 26-29, 2000 abstract</p> <p>-----</p>	I-171

* and IUTISA/210 (qualifier of second phase, in 1993)

International Application No. PCT/US 01/06139

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1,38,94,116,117,129,141,151,152,154,157

In view of the large number and also the wording of the claims presently on file, which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought, the present application fails to comply with the clarity and conciseness requirements of Article 6 PCT (see also Rule 6.1(a) PCT) to such an extent that a meaningful search is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and concise), namely methods of stimulating and concentrating T-cell populations with anti-CD-3 and CD-28 antibodies immobilized on magnetic beads, as showed in and concentrated as disclosed in examples I-XIV.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 (information on patent family members)

 Inventor's name Application No.
 PCT/US 01/06139

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5735279	A	07-04-1998	AU 662927 B2	21-09-1995
			AU 2655192 A	27-04-1993
			CA 2116675 A1	01-04-1993
			WO 9305818 A1	01-04-1993
			EP 0605563 A1	13-07-1994
			JP 6510777 T	01-12-1994
			RU 2137501 C1	20-09-1999
			US 5496534 A	05-03-1996
WO 9701304	A	16-01-1997	WO 9701304 A1	16-01-1997

Form PCT/ISA/216 (updated June 2000) July 2002

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ベレンソン, ロン

アメリカ合衆国 ワシントン 98040, マーサー アイランド, ピー. オー. ボックス
1598

(72)発明者 ロウ, チェ

アメリカ合衆国 ワシントン 98133, ショアーライン, フレモント アベニュー エヌ
18834

(72)発明者 ボニーハディ, マーク

アメリカ合衆国 ワシントン 98029, イッサクア, エスイー 27ティーエイチ スト
リート 27187

(72)発明者 サウンド, ナリンダー

アメリカ合衆国 ワシントン 98177, シアトル, エヌダブリュー 122エヌディー
ストリート 919

(72)発明者 クレイグ, スチュワート

アメリカ合衆国 ワシントン 98029, イッサクア, 267ティーエイチ コート エス
イー 1789

(72)発明者 カラマス, デイル

アメリカ合衆国 ワシントン 98052, レッドモンド, 184ティーエイチ アベニュー
エヌイー 12045

(72)発明者 ハードウィック, アラン

アメリカ合衆国 ワシントン 98136, シアトル, アトラス プレイス エスダブリュー
6312

(72)発明者 マックミレン, デイビッド

アメリカ合衆国 ワシントン 98104, シアトル, サウス ワシントン ストリート 6
01, メトロポリタン パーク, ナンバー412

F ターム(参考) 4B065 AA94X AC20 BA30 BC45 BD50 CA44 CA46

4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 NA14 ZB26